

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET

Gordana Đorđević

**REGULACIJSKI MEHANIZMI EKSPRESIJE VASKULARNOGA  
ENDOTELNOG ČIMBENIKA RASTA U KARCINOMU BUBREGA**

Doktorska disertacija

Rijeka, 2009

Mentor rada: prof. dr. sci. Nives Jonjić

Doktorska disertacija obranjena je dana 15. svibnja 2009. na Medicinskom fakultetu

Sveučilišta u Rijeci, pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Zlatko Trobonjača
2. Prof. dr. sc. Marija Petković
3. Prof. dr. sc. Snježana Tomić
4. Prof. dr. sc. Nives Jonjić

Rad ima 168 listova.

UDK: \_\_\_\_\_

## **PREDGOVOR**

Istraživanje na kojem se temelji ova doktorska disertacija dio je znanstvenog projekta voditeljice prof. dr. sci. Nives Jonjić pod nazivom «Regulacijski čimbenici angiogeneze u prognozi i kliničkom praćenju tumora pod brojem: 062-062005-0082. Istraživanje je provedeno je na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci .

Zahvaljujem se mojoj mentorici prof. dr. sci. Nives Jonjić koja mi je svoje znanje i iskustvo u znanstveno istraživačkom radu nesebično prenijela te pomogla pri izradi disertacije.

Zahvaljujem svima koji su svojim radom doprinijeli istraživanju, posebice laboratoriju za molekularnu dijagnostiku pod vodstvom prof. dr. sci. Blaženke Grahovac, histokemijskom i imunohistokemijskom laboratoriju naročito višim laborantima Ozrenu Štanfelu, Dubravki Rendulić te kolegicama dr. Koviljki Matušan Ilijaš, dr. Emini Sinožić, dr. Iti Hadžisejtić i doc. dr. Sanji Štifter.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za patologiju, posebno mojoj kolegici prof. dr. sci. Elviri Mustać na neprestanom poticanju i podršci.

Na kraju se toplo zahvaljujem mojoj obitelji na velikom razumijevanju i ljubavi.

## SAŽETAK

**Uvod:** Angiogeneza, ili stvaranje novih krvnih i limfnih žila, je neophodna za rast i progresiju tumora, a karcinom bubrežnih stanica idealan model za evaluaciju novih strategija antiangiogene terapije zbog njegove bogate vaskularizacije i visoke ekspresije angiogenih čimbenika. Jedan od najvažnijih promotora angiogeneze je vaskularni endotelni čimbenik rasta ( VEGF) i njegove srodne molekule. VEGF je prekomjerno eksprimiran i na razini mRNA i na proteinskom nivou u humanim tumorima, a brojni čimbenici kroz intracelularne signalne puteve mogu regulirati njegovu pojavnost uključujući hipoksiju i regulatorni transkripcijski faktor HIF1  $\alpha$ , citokine , hormone te modulatore protein kinaze C. Mehanizmi VEGF ekspresije uz sudjelovanje tumor supresorskih gena kao što je p53 ili čimbenika rasta kao na primjer epidermalnog čimbenika rasta (EGF) samo su djelomično poznati.

**Cilj** ovog istraživanja je određivanje imunohistokemijskog izražaja VEGF-A i VEGF-C u svijetlostaničnim karcinomima bubrežnih stanica ( SKBS) u usporedbi s okolnim normalnim tkivom bubrega, te utvrđivanje ekspresije regulacijskih čimbenika HIF1  $\alpha$ , receptora za epidermalni čimbenik rasta (EGFR), p53 tumor supresorskog proteina u tumorskom tkivu uz utvrđivanje odnosa ovih proteina sa angiogenim faktorima VEGF-A i C te odnosa VEGF-A sa gustoćom novostvorenih patoloških krvnih žila. Cilj je također utvrditi metodom fluorescentne in situ hibridizacije da li postoji amplifikacija gena za EGFR u SSKBS te napokon usporediti angiogenezu i ove čimbenike regulacije angiogeneze s kliničko-patološkim parametrima kao što su nuklearni gradus, Ki67 indeks proliferacije tumorskih stanica, veličina tumora, patološki stadij i petogodišnje preživljenje.

**Materijal i postupci:** Na standardnim rezovima 93 SKBS određena je gustoća krvnih žila imunohistokemijskom metodom uz korištenje antitijela CD31 za endotel i na istim rezovima uspoređena sa imunohistokemijskim izražajem VEGF-A..

Izražaj proteina VEGF-A, VEGF-C, HIF1  $\alpha$ , EGFR 1, p53, istražen je metodom imunohistokemije na tkivnim mikroarejima (TMA) istih SKBS-a te uspoređen standardnim statističkim metodama međusobno kao i s kliničkopatološkim parametrima. Metodom fluorescentne in situ hibridizacije (FISH) vizualizirana je amplifikacija EGFR gena u 43 odabrana tumora koji su pokazivali različitu ekspresiju ovog receptora na razini proteina u tumorskim stanicama.

**Rezultati:** Gradus tumora i stadij bolesti su kao glavni prognostički faktori pokazali inverznu korelaciju u odnosu na preživljenje. Studija gustoće krvnih žila u usporedbi s ekspresijom VEGF-A na standardnim rezovima pokazala je da su tumori s vrlo visokom ekspresijom VEGF-A (>75%) povezani s manjim brojem krvnih žila ( $p=0,034$ ). Na TMA je potvrđena promjenjiva ekspresija sva tri analizirana proteina u tumorskim stanicama SSKBS-ova. Angiogeni čimbenici pokazali su međusobnu povezanost ( $p<0,031$ ), a njihova ekspresija se uočavala kao perimembranozno ili difuzno citoplazmatsko obojenje. Nuklearna ispoljenost HIF1 $\alpha$  (n HIF1 $\alpha$ ) pokazivala je obrnutu povezanost s difuznim citoplazmatskim obojenjem VEGF-A ( $p=0,002$ ) i VEGF-C ( $p=0,053$ ), dok je citoplazmatska ekspresija HIF1 $\alpha$  (cHIF1 $\alpha$ ) pokazivala pozitivnu korelaciju s difuznim obojenjem oba angiogena čimbenika ( $p<0,001$  odnosno  $p<0,001$ ). U usporedbi s kliničkopatološkim parametrima, prekomjerna ispoljenost citoplazmatskog cHIF1 $\alpha$  i difuznog citoplazmatskog VEGF-A bila je udružena s višim nuklearnim gradusom ( $p=0,006$  odnosno  $p<0,001$ ), većim tumorima ( $p<0,001$  odnosno  $p<0,001$ ), višim stadijem bolesti ( $p=0,023$ , odnosno  $p=0,0027$ ) te kraćim preživljenjem ( $p=0,018$ , odnosno,  $p=0,024$ ). Nasuprot tome prekomjerna ekspresija nHIF1 $\alpha$  kao i perimembranozna

ispoljenost VEGF-C su bili povezani s boljim dijagnostičkim parametrima kao što su niži nuklearni gradus ( $p=0,006$ , odnosno,  $p<0,001$ ), manji tumori ( $p=0,057$ , odnosno,  $p=0,007$ ) i dulje preživljenje ( $p=0,005$ , odnosno,  $p=0,008$ ). Nadalje, ispoljenost nHIF1 $\alpha$  je pokazivala pozitivnu korelaciju s indeksom proliferacije ( $p=0,022$ ). Veća ekspresija tumor supresorskog proteina p53 bila je povezana sa većim tumorima ( $p=0,007$ ), višim nuklearnim gradusom ( $p=0,048$ ) i stadijem bolesti ( $p=0,036$ ), kao i veći izražaj EGFR koji je kroz histoskor korelirao s višim nuklearnim gradusom ( $p=0,0002$ ) s većim tumorima ( $p=0,018$ ) višim pT ( $p=0,036$ ) te kraćim preživljenjem ( $p=0,046$ ) kod tumora koji su pokazivali samo kontinuirano membransko bojenje. p53 je pokazivao pozitivnu povezanost sa postotkom ekspresije VEGF-C ( $p=0,037$ ), a EGFR je bio proporcionalan sa postotkom difuznog izražaja VEGF-A/C te obrnuto proporcionalno povezan sa postotkom perimembranoznog izražaja. FISH metoda je uočila povezanost polizomije 7 i prekomjerne membranske ekspresije EGFR u SSKBS.

**Zaključak:** Rezultati studije na TMA ukazali su na agresivniji subtip SSKBS-a višeg nuklearnog gradusa koji pokazuje prekomjernu ekspresiju VEGF –A i cHIF1 $\alpha$  i na razini multivarijantne analize što se može smatrati neovisnim prognostičkim značenjem sa mogućim kliničkim implikacijama. Značenje nHIF1 $\alpha$  ekspresije povezano sa bolje diferenciranim tumorima i višim proliferativnim indeksom trebalo bi bolje istražiti. Nadalje, subcelularna lokalizacija angiogenih proteina kao i njihovog transkripcijskog faktora pokazala se važnom u odnosu na prognozu bolesti. Naš tumorski model nije potvrdio jednostavnu povezanost VEGF-A i angiogeneze kroz gustoću krvnih žila, ali se i na standardnim rezovima pokazalo da njegova prekomjerna ekspresija predstavlja lošiji prognostički parametar. Difuzna subcelularna lokalizacija VEGF-A i VEGF-C povezana s EGFR najvjerojatnije je povezana sa mehanizmima tumorigeneze.

Ključne riječi: vaskularni endotelni čimbenik rasta, hipoksijom inducirani čimbenik rasta, p53, epidermalni čimbenik rasta, tkivni mikroareji, karcinom, bubrežnih stanica

## SUMMARY

AIM: The role of angiogenesis in the pathogenesis of renal cell carcinoma is well recognized, however the influence of tumor cells in this activity is still not well-known. First, the purpose of this investigation was to analyze and correlate the immunohistochemical pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression with the average of microvessel density (MVD) and other clinicopathologic parameters in clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) in order to determine its prognostic significance. Secondly we wanted to expand our knowledge on expression of VEGF-A and to compare its value with the VEGF-C expression recognized to be involved in lymph vessel neoangioegenis. Furthermore, the aim was to analyze expression of both angiogenic factors in comparison to Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), a regulatory factor of angiogenic switch, p53 tumor supresor protein and epidermal growth factor receptor (EGFR) which are involved in tumor pathogenesis, and finally all analyzed parameters were compared with clinicopathological characteristics of CCRCC including the patients' survival. We also wanted to investigate the role of EGFR gene copy number changes in relation to EGFR overexpression by means of fluorescence in situ hybridization (FISH).

MATERIAL AND METHODS: This study includes tumor specimens of CCRCC obtained from patients undergoing nefrectomy at the Department of Urology, Clinical Hospital Center Rijeka from 1989-1994. All cases were reviewed using WHO tumor classification criteria. First part of our investigation was performed on surgical specimens of 93 CCRCC wich were immunohistochemically analyzed on parafine embedded , whole slide, standard sections for VEGF expression, MVD with anti-CD31, and Ki 67

proliferative index. Then, the tissue microarrays (TMA) were built from the same reviewed cohort of 94 archive formalin fixed and paraffin embedded CCRCC.

Immunohistochemistry was performed on tissue microarrays for VEGF-A, VEGF-C, HIF-1 $\alpha$  and Ki67, p53 and EGFR expression. The staining was evaluated as a percentage of cytoplasmic, membranous or nuclear positive tumor cells, and as a histoscore (HS). Clinicopathologic data obtained from patient medical records and from files of the Department of Pathology, Rijeka University School of Medicine, Rijeka, Croatia included sex, age, tumor size, TNM stage, histologic subtype and nuclear grade as assessed using Fuhrman nuclear grading system.

**RESULTS:** On the whole tumor slides, VEGF expression was recorded as the percentage of positive tumor cells ( $\geq 75\%$  and  $\leq 75\%$ ) and as diffuse or perimembranous VEGF expression according to cytoplasmic distribution. Statistical analysis showed that tumors with  $\geq 75\%$  of VEGF expression were characterized by lower MVD value ( $p = 0.034$ ), higher nuclear grade ( $p = 0.018$ ), and higher Ki 67 proliferation index ( $p = 0.023$ ). Moreover, a higher nuclear grade of tumor cells was characterized by diffuse cytoplasmic VEGF distribution ( $p = 0.005$ ). The TMA analysis showed the variable expression of analyzed protein in tumor cells among different CCRCC. Both angiogenic factors demonstrated perimembranous or diffuse cytoplasmic staining, with diffuse pattern positively associated ( $p < 0.001$ ). Nuclear HIF-1 $\alpha$  expression (nHIF-1 $\alpha$ ) showed inverse correlation with diffuse cytoplasmic VEGF-A ( $p = 0.002$ ) and VEGF-C ( $p = 0.053$ ), while cytoplasmic HIF-1 $\alpha$  expression (cHIF-1 $\alpha$ ) showed positive correlation with diffuse staining of both angiogenic factors ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ , respectively). In comparison to clinicopathological characteristics, a higher nuclear grade ( $p = 0.006$ ;  $p < 0.001$ , respectively), larger tumor size ( $p = 0.009$ ;  $p = 0.015$ , respectively), higher stage ( $p = 0.023$ ;  $p = 0.027$ , respectively) and shorter survival ( $p = 0.018$ ;  $p = 0.024$ , respectively) were



associated with overexpression of diffuse cytoplasmic VEGF-A and cytoplasmic HIF-1 $\alpha$  expression.

In contrary, overexpression of nHIF-1 $\alpha$  was associated with better diagnostic parameters i.e. lower nuclear grade (p=0.006), smaller tumor size (p=0.057), and longer survival (p=0.005). Expression of p53 protein was recorded as percentage of nuclear positivity /500 tumor celss. Overexpression ( $\geq$  of median score 40.5%) was connected with bigger tumors, higher NG and pT stage (p=0.007, p=0.048, p=0.036 respectively). Intesive membranous EGFR expression in tumors was also related to worse prognostic parameters and lower overall survival (Hscore p=0.046) EGFR showed higher expression in relation to diffuse cytoplasmic distribution of VEGF-A/C but was negatively associated with perimembranous expression of VEGF-A/C. FISH method revealed polisomy 7 associated with protein EGFR overexpression in CCRCC tumor cells. Multivariate analysis underline NG and diffuse cytoplasmic HIF-1 $\alpha$  as an independent prognostic factors.

**CONCLUSION:** Study on standard CCRCC tumor slides did not confirm the postulated simple relationship between VEGF overexpression and angiogenesis through high microvessel count. However, the study results indicated that overexpression of VEGF was a worse histologic prognostic parameter in CCRCC. Survey of CCRCC with TMA technique

highlights more aggressive subtype of CCRCC with overexpression of VEGF-s and cHIF-1 $\alpha$ , p53 and EGFR in tumors cells that might have some clinical implication. A significance of nHIF-1 $\alpha$  expression, associated with better differentiated tumors should be further better understood. FISH analysis showed that EGFR gene dosage can influence on protein ekspresion through polisomy rather than amplification.

**Key words:** VEGF-A; VEGF-C; HIF-1alpha; p53, EGFR, FISH, TMA, Carcinoma, Renal Cell; Prognosis

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NASTANAK KRVNIH ŽILA .....	2
1.2 TUMORSKA ANGIOGENEZA.....	10
1.3 VASKULARNI ENDOTELNI ČIMBENIK RASTA .....	16
1.3.1. VEGF GEN I VEGF MOLEKULE .....	16
1.3.2. VEGF C i D .....	26
1.3.3. VEGF U TUMORIMA .....	27
1.4. HIPOKSIJOM POBUĐENI ČIMBENIK- 1A ( HIF 1A).....	29
1.5. RECEPTOR EPIDERMALNOG ČIMBENIKA RASTA (EGFR) .....	32
1.6. P53.....	37
1.7. KARCINOM BUBREŽNIH STANICA .....	41
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>49</b>
<b>3. ISPITANICI I POSTUPCI .....</b>	<b>51</b>
3.1. BIOPTIČKI MATERIJAL .....	52
3.1.1. STANDARDNI TKIVNI REZOVI.....	52
3.1.2 TKIVNI REZOVI DOBIVENI METODOM TKIVNIH MIKROAREJA .....	53
3.2. POSTUPCI.....	54
3.2.1 IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE .....	54
3.2.1.1. Imunohistokemijsko bojanje na standardnim rezovima .....	54
3.2.1.2. Procijena imunohistokemijskog bojenja na standardnim rezovima.....	55
3.2.1.3. Imunohistokemijsko bojanje na TMA .....	57
3.2.1.4. Procijena imunohistokemijskog bojenja na TMA .....	59
3.2.2. FISH METODA.....	60
3.3. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA .....	66
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>67</b>
4.1. REZULTATI DOBIVENI NA STANDARDNIM TKIVNIM REZOVIMA.....	68
4.1.1. KLINIČKOPATOLOŠKI PODATCI BOLESNIKA SA SSKBS .....	68
4.1.2. REZULTATI DOBIVENI IMUNOHISTOKEMIJSKIM BOJENJEM NA STANDARDNIM REZOVIMA SSKBS .....	68
4.1.3 . POVEZANOST IMUNOHISTOKEMIJSKOG IZRAŽAJA VEGF -A S KLINIČKOPATOLOŠKIM PARAMETRIMA BOLESNIKA SA SSKBS .....	74
4.2. REZULTATI DOBIVENI NA TKIVNIM MIKROAREJIMA SSKBS .....	76
4.2.1. KLINIČKO PATOLOŠKI PODATCI BOLESNIKA SA SSKBS .....	76
4.2.2. REZULTATI IMUNOHISTOKEMIJSKOG BOJENJA VEGF-A, VEGF-C, HIF-1A I P53 NA TMA SSKBS I KLINIČKOPATOLOŠKI PRAMETRI .....	77
4.2.3. KORELACIJA REZULTATA IMUNOHISTOKEMIJSKOG BOJENJA U SSKBS .....	80
4.2.4. REZULTATI IMUNOHISTOKEMIJSKE I FISH ANALIZE EGFR .....	81
4.2.5. KORELACIJA REZULTATA EGFR S OSTALIM IMUNOHISTOKEMIJSKI ANALIZIRANIM PARAMETERIMA .....	84
4.2.6. POVEZANOST SVIH ANALIZIRANIH PARAMETARA NA TMA S KLINIČKOPATOLOŠKIM PODATCIMA BOLESNIKA SA SSKBS.....	86
4.2.6.1. VEGF-A i kliničkopatološki parametri .....	86
4.2.6.2 VEGF-C i kliničkopatološki parametri .....	87
4.2.6.1. HIF-1 $\alpha$ i kliničkopatološki parametri.....	89
4.2.6.4. p 53 i kliničkopatološki parametri.....	89
4.2.6.5. EGFR i kliničkopatološki parametri .....	90
4.3 PREŽIVLJENJE BOLESNIKA SA SSKBS.....	90
4.3.1. PREŽIVLJENJE BOLESNIKA S SSKBS U ODNOSU NA KLINIČKOPATOLOŠKE PARAMETRE	91

4.3.2. PREŽIVLJENJE BOLESNIKA SA SSKBS U ODNOSU NA PARAMETRE IMUNOHISTOKEMIJSKE I FISH ANALIZE .....	92
4.3.2.1. Preživljenje u odnosu na VEGF-A izražaj .....	92
4.3.2.2. Preživljenje u odnosu na VEGF-C .....	93
4.3.2.3. Preživljenje u odnosu na HIF-1 izražaj .....	95
4.3.2.4. Preživljenje u odnosu na p53 izražaj .....	97
4.3.2.5. Preživljenje u odnosu na EGFR izražaj .....	97
4.3.3. MULTIVARIJATNA ANALIZA PREŽIVLJENJA (COX REGRESIJSKI MODEL) .....	98
4.3.3.1. Analiza za VEFG-A .....	98
4.3.3.2. Analiza za VEGF-C .....	100
4.4.3.3. Analiza za HIF-1 $\alpha$ .....	102
4.4.3.4. Analiza za EGFR .....	104
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>105</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>126</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>130</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>146</b>
<b>9. POPIS SKRAĆENICA .....</b>	<b>153</b>

# ***1. UVOD***

## **1.1 NASTANAK KRVNIH ŽILA**

Krvne žile su bile predmetom zanimanja egipatskih liječnika još prije 6000 godina, a Aristotel ih je usporedio sa „vodenim tokovima u vrtovima koji počinju sa izvora, granaju se u brojne kanale pa mogu opskrbiti svaki djelić vrta“.

Normalan život tkiva ovisi o intaktnom krvožilju, a oštećenje krvne opskrbe može rezultirati odumiranjem stanica. Abnormalan i prekomjeran rast krvnih žila može dovesti do brojnih poremećaja, od ubrzanog rasta tumora i pogoršanja upalnog procesa, preko preranog rođenja djeteta, debljine, demencije, do naoko nevažnog gubitka kose. (1)

Poznata su najmanje tri mehanizma stvaranja krvnih žila.

**Vaskulogeneza** se definira kao nastanak krvnih žila iz endotelnih progenitorskih stanica koji dolaze iz različitih embrionalnih regija, točnije mezoderma. Za vrijeme ranog embrionalnog razvoja, vaskulogeneza mezoderma splanhnične regije je intimno vezana za nastanak hematopoeze pa se uspostavio i termin hemangioblast koji bi označavao bifazičnog zajedničkog prekursora hematopoetskih i endotelnih stanica (Es) (2). U području somatskog mezoderma nalaze se monofazični prekursori odnosno angioblasti. U odraslih osoba endotelne progenitorske stanice su osim u koštanoj srži nađene u perifernoj krvi i masnom tkivu odraslih, a osim njih nalaze se i novi izvori ne-endotelnih progenitorskih stanica koji mogu poticati vaskulogenezu te biti iskorišteni u terapiji kroničnih bolesti (3,4). **Angiogeneza** je proces nastanka novih krvnih žila pupanjem iz postojeće krvožilne mreže kada se endotelne stanice generiraju iz endotela okolnih krvnih žila stvarajući izdanke. Kasnije se u procesu arteriogeneze ovi izdanci stabiliziraju dijeljenjem i sazrijevanjem muralnih stanica.

Treći način nastanka krvnih žila sličan je angiogenezi. Radi se o ekspanzivnom rastu i remodeliranju pre-egzistirajuće vaskularne mreže stvaranjem premoštavajućih ogranaka takozvanih **kolateral** (1). Bolja perfuzija tkiva postiže se daljnjim pupanjem proksimalnih žila pa mali distalni vaskularni prostori, kapilare, mogu doprinijeti opskrbi svake stanice.

Male krvne žile se sastoje samo od endotelnih stanica dok su veće okružene pericitima i glatkomišićnim stanicama. Stoga postoje različiti mehanizmi koji potiču diferencijaciju i dijeljenje ovih stanica (5). Yamashita i suradnici otkrili su zajednički vaskularni prekursor koji se, ovisno o utjecaju različitih faktora rasta, može diferencirati u endotel ili glatke mišićne stanice, odnosno pericite što prikazuje slika 1.

#### **Slika 1. Razvoj vaskularnih stanica.**

Hemangioblasti derivirani iz mezoderma migriraju u žumanjčanu vreću gdje formiraju krvne otočiće u kojima se diferenciraju u angioblaste ili primitivne hematopoetske stanice. Intraembrioni angioblasti se također deriviraju iz mezodermalnih stanica prekursora. Fibroblasti čimbenik rasta je važan za napredovanje hemangioblasta od mezodermalnog prekursora. Vaskularni endotelni čimbenik rasta podržava diferencijaciju u krvne vaskularne endotelne stanice dok iz trombocita derivirani čimbenik rasta ima ulogu diferencijacije u pericite odnosno glatkomišićne stanice vaskularne stijenke. (Prilagođeno prema: Carmeliet P. Developmental biology: One cell, two fates. Nature2000; 408: 43-45)

Vaskularni endotelni čimbenik rasta (iz engl. Vascular endothelial growth factor, VEGF) može promovirati razvoj endotelne stanice iz prekursora dok iz trombocita nastali čimbenik rasta (iz engl. Platelet derived growth factor, PDGF-BB) stimulira diferencijaciju u pericite ili glatkomišićne stanice (6).

U današnje vrijeme tkivnog inženjeringa za razvoj i konstrukciju bilo kakvog tkiva treba stabilna mikrovaskulatura koja ostaje jedan od glavnih izazova tkivne izgradnje. Najnoviji podatci eksperimentalnih radova govore da se razvoj stabilne i zrele vaskulature temelji

ne samo na endotelnoj proliferaciji i migraciji, nego i na suradnji između endotelnih stanica i pericita (7). Danas se pretpostavlja da se periciti deriviraju iz prekursora mezenhima i to onih koji okružuju krvne žile, uspostavljaju kontakt s brojnim endotelnim stanicama prenoseći angiogene signale samim kontaktom i djelujući parakrino. Ovakva komunikacija u oba smjera dovodi do endotelne diferencijacije i prestanka dijeljenja stanica (8). Tako, obje vrste stanica predstavljaju temelj vaskularnog sazrijevanja i stabilnosti. Eksperimentalni radovi Melero-Martin i suradnika dokazali su da se zrela, održiva i funkcionalna vaskularna mreža može konstruirati upotrebom dvaju tipa stanica, endotelnih progenitorskih stanica i mezenhimalnih progenitorskih stanica koje se mogu jednostavno izolirati iz periferne krvi ili koštane srži odrasle osobe (9). Tako se savladala prva stepenica u konstrukciji krvnih žila, a primjena ovog pristupa u vaskularizaciji specijaliziranih tkiva zadatak je budućih istraživanja.

Osim muralnih stanica novonastajuće vaskulature potrebna je i aktivnost ekstracelularnog matriksa (iz engl. Extracellular matrix, ECM) te specijalizacija stanica stijenke za strukturalnu podršku i regulaciju funkcije same žile. Suradnja svih navedenih struktura je omogućena kroz aktivaciju, lučenje i regulaciju multiplih vaskularnih faktora.

Novonastale krvne žile propuštaju plazma proteine koji služe kao privremeni matriks kroz koji migriraju endotelne stanice te proliferiraju potaknute endotelnim mitogenima.

Stabilizacija novonastalih krvnih žila omogućena je proliferacijom muralnih stanica te zrelog ekstracelularnog matriksa i danas su poznati signalni putevi koji reguliraju taj proces prikazani na sljedećim tablicama, a mogu se podijeliti na tri skupine: ligande i receptore (tablica 1), molekule koji upravljaju interakcijom između stanica (tablica 2) te one koje upravljaju interakcijom stanica i ekstracelularnog matriksa (tablica 3) (10).

**Tablica 1. Ligandi i receptori u procesu nastanka i regulaciji krvnih i limfnih žila**

Ligand/receptor (tip stanice)	Moguće djelovanje
VEGF/VEGFR1, (Es)	pojačana regulacija proteaza za ECM organizaciju, ostvaruje privremeni ECM pojačavajući propustljivost, pojačana regulacija PDGF- $\beta$ za regrutaciju muralnih stanica za stabilnost krvnih žila, suprimira apoptozu inducira specijalizaciju endotela
VEGF <sub>164</sub> /VEGFR2 i NRP1 (Es)	promocija rasta arterija(?)
VEGFC/VEGFR3 i NPR2	provodi razvoj limfnih žila
EG-VEGF/PKR1,2 (Es)	inducira fenestraciju endotela
EpinephrinB2/ephB4 (Es,muralne s)	određuje specijalizaciju krvnih žila prema arterijama ili venama, vodi grananježila
PDGFB/PDGFR- $\beta$ (Es, muralne s.)	promovira proliferaciju, migraciju, regrutaciju muralnih stanica
SP1/EDG1 (Es, muralne s.)	promovira regrutaciju muralnih st.(nizvodno od PDGF B signalizacije
Ang1/Tie2 (Es)	stabilizira krvna žile olakšavajući interakciju Endotel-muralne st i Endotel–matriks, suprimira apoptozu inducira hijerarhijski aranžman vaskularnog grananja u odsutnosti muralnih stanica
Ang2/Tie2 (Es)	inducira apoptozu u odsutnosti VEGF određuje izgled limfnih žila
Ang1/Tie 1,2 (Es)	koordinira polaritet vaskularizacije
TGF- $\beta$ 1/TGF BRII (Es, muralne s)	promovira produkciju ekstracelularnog matriksa, promovira diferencijaciju od fibroblasta preko Miofibrobasta u muralne stanice kroz serum odgovorni čimbenik
TGF- $\beta$ 1/ALK1(Es)	regulira proliferaciju i migraciju endotelnih stanica (aktivacijska faza)
TGF- $\beta$ 1/ALK5(Es)	regulira maturaciju žila (faza rezolucije)
TGF- $\beta$ 1/ALK1 i endoglin(Es)	promovira arterio-venoznu specijalizaciju
Syk/SLP76 put	odvaja limfne od krvnih žila

**Tablica 2. Molekule koje upravljaju interakcijom između endotelne stanice i muralne stanice**

Molekule	Moguće uloge
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>\alpha 5\beta 1</math>, <math>\alpha 1\beta 1</math>, <math>\alpha 2\beta 1</math>, <math>\alpha v\beta v</math>, <math>\alpha v\beta 5</math> (Es)</li> <li>• Proteaze (Es, muralne stanice)</li> <li>• Inhibitori proteaza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suprimiraju apoptozu endotela</li> <li>• Formiraju oznake za izgled krvnih žila oslobađajući čimbenike rasta, cijepaju molekule matriksa, plazme, proteaze: ovakvi produkti molekula uzrokuju apoptozu endotela</li> <li>• Stabiliziraju krvne žile prevenirajući raslojavanje matriksa</li> </ul>

**Tablica 3. Molekule koje upravljaju interakcijom između stanica i ekstracelularnog matriksa**

Molekule	Moguće uloge
<ul style="list-style-type: none"> <li>• VE – cadherin (Es)</li> <li>• N.cadherin (Es, muralne stanice)</li> <li>• Connexini (Es, muralne stanice)</li> <li>• Okludini, kladini, zona okludins (ZO1,2,3 (Es)</li> <li>• CD 148 (Es)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formiraju spoj među endotelnim stanicama</li> <li>• Olakšavaju komunikaciju između endotelnih i muralnih st</li> <li>• Olakšavaju komunikaciju između endotelnih stanica međusobno i endotelnih i muralnih st</li> <li>• Formiraju čvrste veze između endotelnih st. u moždanim i retinalnim kapilarama</li> <li>• Reguliraju interakciju između endotelni i muralnih st.</li> </ul>

Najmanje razumljiv je proces maturacije organ – specifičnih specijaliziranih krvnih žila posebne strukture stijenke i vaskularne arhitekture te razvoj limfnih žila. Neki izvori sugeriraju da nastanak i razvoj limfovaskularne mreže diktira protok intersticijalne tekućine (11).



ECM igra značajnu ulogu u rastu krvnih žila ne samo zbog strukturne podrške nego i zbog brojnih signalnih puteva te faktora rasta koji se deponiraju u okolini krvnih žila.

Jedna od prvih stepenica u rastu krvnih žila iz postojeće vaskulature je degradacija subendotelne bazalne membrane i okolnog ECM. Nekoliko porodica proteinaza koje omogućuju proteolitičku razgradnju je prisutno u matriksu uključujući i plazminogen aktivator i njegov inhibitor, matriksne metaloproteinaze (MMP) te tkivno specifične inhibitore MMP, heparanaze, dymaze, tryptaze, katepsine i mnoge druge. Uz to što čiste put za migraciju endotelnih stanica kroz prostor razgrađujući komponente ECM, proteinaze mogu i potaknuti angiogenezu oslobađanjem angiogenih čimbenika. Imajući na umu kritičnu ulogu proteolitičkog remodeliranja ECM u angiogenezi jasno je da se ono mora odvijati pod kontrolom inhibitornih mehanizama. Ekcesivna degradacija ECM dovodi do gubitka podrške i određivanja korita za migraciju endotelnih stanica, dok smanjena razgradnja matriksa ne dopušta endotelnim stanicama da napuste svoje prvotno mjesto. Obje situacije dovode do inhibicije angiogeneze. Proteaze uključene u angiogenezu mogu djelovati intra i ekstracelularno. Intracelularne proteaze degradiraju ne samo deformirane proteine nego sudjeluju u kontroli transkripcijskih faktora koji reguliraju angiogene čimbenike te u lizozomima kontroliraju razgradnju internaliziranih regulatornih proteina i ingestiranih proteina ekstracelularnog matriksa. Kaspaze su u stanici ključni regulator apoptoze endotelnih stanica. Ekstracelularno, dobro koordinirana pericelularna proteolitička aktivnost metaloproteinaza i njihovih tkivnih inhibitora kontrolira dostupnost angiogenih faktora i citokina. Oni mogu biti oslobođeni iz ekstracelularnog matriksa i aktivirani razgradnjom proteoglikana, većih kompleksa unutar potpornog tkiva i tako oslobođeni, direktno ili indirektno sudjelovati u poticanju angiogeneze (12). Degradacijom ECM od strane endotelnih stanica dolazi do stvaranja prostora koji se nazivaju vaskularni tuneli (engl. vascular guidance tunnels), a predstavljaju

fizički otisak u matriksu unutar kojega se događaju celularna kretanja, formacija i remodeliranje vaskularnih cijevi neovisno o matriksnim metaloproteinazama. Unutar nekoliko dana u ovim se tunelima regrutiraju i proliferiraju periciti koji opet neovisno o proteazama stupaju u interakciju s endotelnim stanicama . Istraživanja su pokazala da jedino u prisutnosti pericita u vaskularnim tunelima dolazi do depozicije komponenata bazalne membrane kao što su kolagen tipa IV, laminin, nidogen1/2 i perlekan. U odsutnosti pericita u tom prostoru EC luče ove spojeve ali ne dolazi do njihove lokalne depozicije i formiranja bazalne membrane te stabilizacije endotelne tube (13). Clark i suradnici su 1938. god. u studiji o fiziološkoj neovaskularizaciji demonstrirali da rastući pupoljci postaju funkcionalne kapilarne tube pri promjeni perivaskularnog matriksa u gel stanje. To je vjerojatno prvi opis uloge ekstarcelularnog matriksa i bazalne membrane u angiogenezi. Danas je poznata kompleksna sekvenca događaja .Velika promjena u matriksu u lokaliziranom području dovodi do mehaničkih promjena u smislu natezanja i stanjenja bazalne membrane na mjestima stvaranja novih kapilarnih korita . Dolazi također do promjena u citoskeletu endotelnih stanica kao reakcija na promijenjen status adhezijskih molekula u tom dijelu stijenke i okružja, što opet potiče stanični rast i motilitet (14). Ovakav način nastajanja novih kapilarnih korita opisan je kao pupajuća angiogeneza. To je relativno spor proces koji zahtijeva oko 3-5 dana dok novostvorena krvna žila bude stabilna i integrirana u vaskularnu mrežu.

1986. godine opisana je brzorastuća pulmonarna kapilarna mreža na eksperimentalnom modelu neonatusa štakora. Djonov i suradnici su ovaj način angiogeneze prikazali u serijskim rezovima elektronskim mikroskopom kada se vidjelo da se rastom krvne žile prema lumenu sa perforacijom endotelnog dvosloja i reorganizacijom intercelularnog kontakta intraluminalno i longitudinalno, stvaraju nove kolone između kojih se nalazi intersticij koji je uskoro invadiran miofibroblastima i pericitima sa depozicijom kolagena.

Prednost ovog mehanizma, koji je shematski prikazan na slici 2, pred pupajućom angiogenezom je puno brža neovaskularizacija koja ne zahtijeva ekstenzivnu degradaciju bazalne membrane ili proliferaciju endotelnih stanica a novonastala kapilarna mreža je stabilnija i manje propusna (15).

**Slika 2: Shematski prikaz nastanka krvnih žila intusucepcijom**

(Prilagođeno prema slici iz Djonov V, Baum O, Burri PH, Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. Cell Tissue Res (2003);314:107-117

**Specijalizirane krvne žile:** Najmanje istražena i razumljiva stepenica u razvoju i stabilizaciji krvnih žila je nastanak specijaliziranih tkivno i organ specifičnih krvnih žila i njihove mreže. Ovaj proces uključuje arterio-venozno određenje, formaciju homotipičnih i heterotipičnih spojeva te diferencijaciju endotelnih stanica za formiranje organ specifičnih kapilarnih struktura. Homotipične i heterotipične veze, zajedno sa vezama endotelnih stanica međusobno, endotelnih stanica i muralnih stanica, vezama unutar pukotina između stanica olakšavaju komunikaciju te kontroliraju propusnost krvnih žila. Vaskularni endotelni kadherin je važan u komunikaciji endotelnih stanica, neuralni kadherin u komunikaciji između endotelnih i muralnih stanica. Pukotinske veze sačinjene su od koneksina (engl. connexins) koji također olakšava prijenos podataka između samih endotelnih stanica, te endotelnih i perivaskularnih stanica. CD31 molekula olakšava ekstravazaciju leukocita sudjelujući u njihovoj komunikaciji s endotelom u području spojnica sačinjenih od okluzina, kladina i zone okludens. Ove čvrste spojnice sudjeluju u ostvarivanju krvno tkivne barijere u mozgu i retini. Konačno, angiogeni faktori kao VEGF i receptor vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGFR) u endokrinim

žlijezdama induciraju fenestraciju endotelnih stanica. Kako lokalni mehanizmi ili biokemijski mikrokoliš kontroliraju formaciju kontinuiranog, diskontinuiranog i fenestriranog endotela još uvijek ostaje predmetom istraživanja (10).

## **1.2 TUMORSKA ANGIOGENEZA**

Brojna humana oboljenja su karakterizirana abnormalnom vaskulaturom, a u solidnim tumorima patološka vaskularizacija je jedno od glavnih obilježja.

Izgled krvnih žila u tumorima je prepoznat prije mnogo stoljeća kada je Fallopio (1600) primijetio dilatirane krvne prostore, dok je Hunter je našao veći broj vaskularnih prostora (1828). Ipak, sustavno proučavanje tumorske vaskulature započelo je s Goldmanom (1907), a Lewis (1927), Ide (1939) i Algire (1945) su postepeno otkrivali prirodu samog procesa.(16). Njegovu važnost shvatio je i sumirao Judah Folkman, začetnik ideje o antiangiogenoj terapiji i kontroli tumora kroz kontrolu njegove vaskularizacije. 1973. godine je na trećoj konferenciji o embrionalnim i fetalnim antigenima u karcinomima izvještavao o tumor angiogenesis faktoru (TAF) i istraživanjima koja su podastrijela dokaze da postoji komunikacija između domaćina i tumorskih stanica koje su sposobne stimulirati proliferaciju novih kapilara potrebnih za progresivan rast. Tako su se postavile smjernice istraživanja fokusiranih na dvosmjernu komunikaciju endotela i tumorskih stanica to jest nove kapilare inducirane od tumorskih stanica imaju ključnu ulogu u daljnjem rastu tumora (17). Rast solidnih tumora podijelio je u dvije faze: fazu prije i fazu poslije vaskularizacije. Studije su pokazale da većina solidnih tumora može preživjeti difuzijom dok ne dostignu veličinu od nekoliko milimetara nakon čega nove krvne žile penetriraju u tumor. Također se znalo da tumori ne mogu započeti vaskularizaciju sami nego moraju „izvući“ te žile iz domaćina koje tada u susjedstvu tumora izrazito proliferiraju. Udaljenost mogućeg utjecaja tumorskih stanica na endotelne stanice i

njihovu proliferaciju može biti od 3 do 5 milimetara i dokazalo se da krvne žile uvijek rastu jednosmjerno od domaćina prema tumoru a nikad obratno od tumora prema zdravom tkivu. To je također značilo da avaskularni začeci tumora nisu autonomni glede opskrbe kisikom i hranjivim tvarima te eliminaciji katabolita. (17,18). Tada je u tumorskim stanicama otkriven i opisan slobodni faktor koji može inducirati rast novih kapilarnih izdanaka nazvan TAF . Uočena je važnost ove molekule bez koje bi tumori ostali „uspavani“ i promjera samo nekoliko milimetara (17). Ideja da se inhibicijom ovog faktora odgovarajućim protutijelom kontrolira tumorska angiogeneza otvorila je široko vrata novim istraživanjima koja su danas i stvarno dovela do razvoja antiangiogene terapije primjenjive u svakodnevnoj praksi. Proučavanjem angiogeneze kako tumorske tako i normalne došlo je do otkrića brojnih novih važnih molekula i razumijevanja mehanizama konstrukcije održive vaskularne mreže u tumorskim i normalnim tkivima unutar tkivnog inženjeringa kao nove terapijske discipline.

Novi zaokret i inovativni koncept u istraživanju antiangiogene terapije datira iz 2001. godine kada Jain i suradnici počinju govoriti o normalizaciji tumorske vaskulature (19). U normalnom tkivu postoji ravnoteža između vaskularnog rasta i staničnih potreba pa niti jedna krvna žila nije udaljenija od stanice kojoj pruža punu opskrbu. Nedostatak takve prostorne ravnoteže u tumorima rezultira brojnim avaskularnim, hipoksičnim prazninama (20). Strukturne abnormalnosti stijenki krvnih žila također opažene u tumorima djelomično su vjerojatno rezultat pritiska proliferirajućih tumorskih stanica na nezrele krvne žile pa dolazi do promjene kako promjera žila, tako i veza među stanicama uz stvaranje fenestracija ili vesikularnih vakuolarnih organela. Endotelne stanice se preklapaju, a njihov ulazak u apoptozu ili prisutnost heterogenosti ekspresije adhezijskih molekula zbog djelovanja angiogenih ili antiangiogenih faktora također remeti prostornu ravnotežu pa nema pravilne interakcije između krvnih žila i stanica te ekscelularnog

matriksa.(10). Promjene su prisutne i u ostalim muralnim stanicama uz nedostatak ili prekomjernu proliferaciju muralnih stanica, a intravitalne i imunohistokemijske studije pokazuju da periciti povezani s tumorom imaju abnormalnu morfologiju i formiraju slabu vezu s endotelnim stanicama (21). Prvi korak u stvaranju novog izdanka krvne žile ili faza aktivacije je odvajanje pericita i degradacija bazalne membrane koja je u solidnom stanju i pod utjecajem enzima prelazi u solubilno stanje pri čemu proliferirajuće endotelne stanice lako migriraju. Tumorske krvne žile imaju iregularnu bazalnu membranu, ona je nerijetko inkopletna ili odsutna kao i pericitni pokrov pa je ovaj proces migracije endotelnih stanica ili formacijska faza angiogeneze u tumorima još lakša nego u normalnom tkivu. Kako nema adekvatnog pericitnog sloja nema pravilne podjele između arteriola i venula, pretežno se radi o nezrelim prostorima nalik na venule ili miješanim krvno-limfatičnim kapilarama. Rezultat je nepravilna, izrazito propusna vaskulatura s kaotičnm protokom krvi uz neadekvatno oksigenirano tumorsko tkivo što se vidi na slici 3 koja pokazuje postepeni razvoj tumorske vaskulature (14,22,23). Hipoksija, genetske promjene u tumorskim stanicama, oksidativni i mehanički stres te smanjeni dotok glukoze mogu rezultirati angiogenezom. Ona je regulirana pro i antiangiogenim faktorima, neki od njih su pokazani na slici 4. Predominacija jednih ili drugih, aktivatora ili inhibitora diktira da li je endotelna stanica u mirovanju ili angiogenom stanju. Vjeruje se da promjene u ovoj ravnoteži posreduju ili djeluju kao takozvani angiogeni prekidač ( engl. switch ).

### **Slika 3. Shematski prikaz postepenog razvoja tumorske vaskulature**

a) gotovo svi tumori počinju rasti kao avaskularni nodusi dok ne postignu ravnatežu apoptoze i proliferacije, angiogeni preokret (switch) nastaje kada tumor zatraži kisik i nutritijente za svoj rast  
b) angiogeneza započinje dilatacijom krvnih žila i perivaskularnim odvajanjem  
c) započinje stvaranje izdanaka, d) nove krvne žile sazrijevaju, dolazi do popunjavanja perivaskularnim stanicama  
e) novostvorene krvne žile su neprevilne i specifično opskrbljuju tumor da može rasti ( prilagođeno prema Bergers G. Benjamin E. L . Tumorigenesis and angiogenic switch Nature Reviews Cancer.2003;3:401-410)

#### **Slika 4. Angiogeni ravnoteža**

angiogeneza je regulirana pro i antiangiogenim čimbenicima, promjene u ovoj ravnoteži djeluju kao takozvani angiogeni prekidač ( engl. switch) (prilagođeno prema Gjini E, Tumor Angiogenesis A review on Established and Innovative Concepts in Antiangiogenic Therapy, Msc Dissertation 2005, Drug innovation Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Utrecht )

Kroz razvoj strategija anti-angiogene terapije koje idu u nekoliko pravaca došlo je do razmimoilaženja pretkliničkih i kliničkih studija pa obećavajuće antiangiogene supstance u pretkliničkim istraživanjima nisu polučile uspjeh u liječenju tumora u kliničkim studijama. Došlo se do zaključka da abnormalna vaskulatura i mikrookoliš predstavljaju veliku zapreku isporuci i efikasnosti antiangiogenih supstanci primijenjenih u liječenju solidnih tumora. Izrazito propusne krvne žile omogućavaju slobodnu cirkulaciju tumorskih stanica u krvotok sa mogućnošću stvaranja udaljenih metastaza. Heterogena cirkulatorna mreža generira mikrookoliš karakteriziran hipoksijom, intersticijskom hipertenzijom i acidozom. Sama hipoksija je odgovorna za činjenicu da su tumorske stanice rezistentne na radio i kemoterapiju Hipoksija je odgovorna za indukciju genetske nestabilnosti sa razvojem novih, malignijih klonova tumorskih stanica. Zbog toga je načinjen zaokret u istraživanjima sa idejom normalizacije tumorske vaskulature koja će biti sposobna isporučiti lijekove u svaki dio tumora bez obzira da li se radi o citotoksičnoj ili antiangiogenoj terapiji koja ima za cilj regresiju tumorske mase. Jain i suradnici su tako, naglašavajući važnost restauracije ravnoteže pro i antiangiogenih supstanci došli do protokola koji preko tranzicijske faze normalizacije tumorske vaskulature dovodi i do faze u kojoj je neadekvatna te uvodi tumor u regresiju i početnu fazu «uspavanosti» što shematski prikazuje slika 5 (24).

### **Slika 5. Normalizacija tumorske vaskulature kroz uspostavljanje ravnoteže između pro i antiangiogenih faktora**

novi koncept terapijskog protokola ( prilagođeno prema slici iz Jain R.K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. Nature Medicine, 2001; 9:987-989.(19)

Unutar ove hipoteze normalizacije tumorske vaskulature Vaskularni endotelni čimbenik rasta VEGF ( engl. Vascular Endothelial Growth Factor) pokazao se jednim od najvažnijih angiogenih faktora koji sudjeluju u ravnoteži angiogenih supstanci na koje se može utjecati. U studiji (19) blokiranje signala od strane VEGF-a pokazalo je obratne efekte na tumorsku vaskulaturu u smislu stvaranja krvnih žila koje su manje dilatirane sa bazalnom membranom urednih karakteristika te opsežnijim i čvršćim pericitnim pokrovom.

Stoga ne čudi da smo upravo ovaj angiogeni čimbenik i njegove regulatorne mehanizme željeli bolje rasvijetliti i kroz ovo istraživanje.

## **1.3 VASKULARNI ENDOTELNI ČIMBENIK RASTA**

### **1.3.1. VEGF gen i VEGF molekule**

Gen VEGF-a lociran na kromozomu 6p21.3 je klonira u ranim osamdesetima. Sastoji se od 8 exona odvojenih sa 7 introna kao što prikazuje slika 6 (25).

### **Slika 6: Prikaz različitih varijanti sinteze jednog gena**

prilagođeno prema slici iz Gjini E, Tumor Angiogenesis A review on Established and Innovative Concepts in Antiangiogenic Therapy, Msc Dissertation 2005, Drug innovation Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Utrecht (24)



Ekspresija VEGF-a je regulirana brojnim situacijama kao što su hipoksija, smanjenje koncentracije glukoze, različiti citokini, oksidativni i mehanički stres te mutacije onkogeni i tumor supresorskih gena.

VEGF molekula je homodimerni glikoprotein, sa monomerom vezanim sa 2 disulfidne veze. VEGF familija se sastoji od 6 faktora rasta naime VEGF-A, B, C, D E i PlGF koji u posebnim staničnim tipovima djeluju različito što prikazuje slika 7 (26) .

### **Slika 7. Uloga receptor tirozin kinaza u različitim staničnim tipovima**

VEGFR-1 i VEGFR-2 su eksprimirani uglavnom na površini endotelnih stanica krvnih žila dok je VEGFR-3 ograničen na endotelne stanice limfnih žila. VEGFR-2 je glavni medijator mitogeneze i preživljavanja endotela, angiogeneze i vaskularne permeabilnosti dok VEGFR-1 može odvojiti VEGF inhibirajući interakciju s VEGFR-2 (decoy efekt), inducira kemotaksiju monocita, a u hematopoetskim stanicama posreduje signal za kemotaksiju i preživljenje. VEGFR-3 je receptor za VEGFC i VEGFD i većinom ograničen na limfni endotel. (Prilagođeno iz: Ferrara N, Gerber HP, Le Coutre J, Nature Medicine.2003; 9: 669 – 676 (26)

**VEGF-A** koji je sinonim za VEGF nazvan i Vaskularni Faktor Permeabilnosti egzistira u 6 izoforma: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF 189 i VEGF206 (slika 8), koji su nastali različitim sintezama (splicing) jednog gena (25).

### **Slika 8. Struktura egzona VEGF-A mRNA varijanata**

prilagođeno prema slici iz Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T and Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction, Trends in Biochemical sciences 2003; 9(28):488-494

Dvije od ovih izoforma VEGF-121 i VEGF-165 su uobičajeno eksprimirani u solidnim tumorima.

VEGF-A je prekomjerno izražen u tumorskim stanicama, makrofagima, T-stanicama, bubregu i glatkomišićnim stanicama. VEGF kroz kontrolu rasta, remodeliranja, preživljavanja i regresije endotelnih stanica održava plastičnost i prostornost vaskularne

mreže kako za vrijeme embriogeneze tako i u odraslom dobu. VEGF-A ne samo da započinje stvaranje krvne žile već aktivira lanac molekularnih i celularnih događanja koji dovode do stvaranja zrele vaskularne mreže (10). Ovi biološki učinci su posredovani putem 4 VEGF receptora: VEGF-R1; R2; R3 i neuropilin-1 također znani u literaturi kao flt-1, flk/KDR, flt-4 i NP-1. Prva 3 receptora su klasični tirozin-kinaza receptori sa ekstracelularnom domenom koja sadrži 7 imunoglobulinima sličnih regija što se vidi na slici 9.

**Slika 9. Ilustracija VEGF familije i receptora te njihova uloga u angiogenezi i limfangiogenezi.**

VEGF -A vezan za VEGF-R1 stimulira proliferaciju endotela, regulira intracelularne interakcije za vrijeme stvaranja kapilara i stimulira migraciju endotela. Vezanje VEGF-a za VEGF-R2 rezultira posredovanjem u diferencijaciji endotela. Kada se VEGF veže za VEGF-R 3 počinje kaskada intracelularnih događaja odgovornih za fiziološki odgovor na vanjski stimulus. Vezanje VEGF-a na NP1 vjerovatno igra ulogu u stimulaciji migracije endotela što još nije do kraja razjašnjeno ( prilagođeno prema slici iz Gjini E, Tumor Angiogenesis A review on Established and Innovative Concepts in Antiangiogenic Therapy, Msc Dissertation 2005, Drug innovation Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Utrecht (24).

VEGF-R1 i VEGF-R2 su locirani na vaskularnom endotelu dok je VEGF-R3 nađen u limfnim žilama (24). Svi ovi receptori su prekomjerno eksprimirani u tumorskom endotelu. VEGF receptor (VEGFR-2 ) pozitivni angioblasti formiraju vaskularnu mrežu koja daje dorzalnu aortu, kardinalnu venu i embrionalno deblo arterija i vena iz žumanjčane vreće. Pupajuća angiogeneza je olakšana hipoksijom tkiva koja ujedno i pojačava izražaj mnogih gena uključenih u taj proces potičući i transkripciju angiogenih čimbenika.(10).

VEGF-A inducira ekspresiju antiapoptotičnih proteina u endotelnim stanicama kao što su bcl2, A1 te p53 (27). Originalno je opisan kao vaskularni faktor permeabilnosti jer inducira promjene u propusnosti endotela kroz formaciju transcelularnih prolaza, veziko-vaskularnih organela, vakuola i fenestracija (28). VEGF-A inducira vazodilataciju kroz

indukciju proizvodnje endotelnog NO (duškovog oksida) (29). Vežući se za receptore na hematopoetskim matičnim stanicama inducira njihovu mobilizaciju iz koštane srži, kemotaksiju monocita, koštanu proizvodnju posredovanu osteoblastima, stimulira regrutaciju upalnih stanica i ekspresiju proteaza koje sudjeluju u degradaciji bazalne membrane u ranim fazama angiogeneze (30). Ubikvitarno je rasprostranjen u svim embrionalnim tkivima ali najjače na mjestima aktivne vaskulo i angiogeneze (31). Homozigotni VEGF knockout miš umire vrlo rano u embriogenezi zbog defekata u stvaranju ranih krvnih otočića, razvoja i diferencijacije endotela te formacija kapilarnih cijevčica (32). Nivoi VEGF-A su također izuzetno važni u ranom razvoju jer miš koji ima gubitak i jednog jedinog alela umire u ranom dobu zbog defekata u razvoju vaskulature. Različite biološke funkcije VEGF-A izoforma su istraživane pomoću izoform specifičnih knockout miševa. Tako miš koji eksprimira samo VEGF<sub>120</sub> (humani VEGF<sub>121</sub>) umire nakon rođenja zbog letalne ishemične miokardiopatije. Miševi koji nose samo VEGF<sub>188</sub>, (humani VEGF<sub>189</sub>) imaju poremećeni razvoj arteriola i polovica ih umire na porodu. Jedino su eksperimentalni miševi koji ekspimiraju VEGF<sub>164</sub> (humani VEGF<sub>165</sub>) živi i zdravi što naglašava važnost ove izoforme kao glavnog VEGF djelovatelja (33,34). VEGF-A se prekomjerno eksprimira praktično u svim solidnim tumorima uključujući i hematološka maligna oboljenja. Kliničko patološka obilježja tumora te preživljenje pacijenta također su značajno povezani sa ekspresijom VEGF-A.

Nedavno su Bates i suradnici opisali varijantu VEGF-A od 165 aminokiselina i nazvali je posebnom izoformom VEGF-A<sub>165b</sub> koja demonstrira inhibitorni efekt na proliferaciju, migraciju endotelnih stanica ili na vazodilataciju krvnih žila (35). Sve forme VEGF-A posjeduju exone od 1-5 i exon 8 koji je, smatra se, promijenjen kod VEGF<sub>165b</sub>. Uključenje exona 7 kodira VEGF<sub>165</sub>, a exona 6 i 7 VEGF-A<sub>189</sub> (36). Razlike u biološkoj aktivnosti između VEGF-A izoformi su ovisne o inkorporiranim exonima. Tako exon 1 kodira

signalnu sekvencu, exon 2 N terminalni kraj, exon 3 domenu dimerizacije, dok 3 i 4 kodiraju domenu vezanja na receptore VEGFR1 odnosno VEGFR2. Exoni 6 i 7 omogućavaju kapacitet vezanja za heparin ili heparan sulfat proteoglikane. Dodatno, exon 7 kodira mjesto vezanja za Neuropilin 1 opisan kao koreceptor za VEGF koji povećava afinitet specifičnih izoforma VEGF za njihove receptore.(37,38). Exon 8 je potreban za stimulaciju mitoze. Tako, različitim kombinacijama sinteze mRNA nastaju izoforme koje se razlikuju u topivosti, a duže forme se zadržavaju uz proteoglikane na staničnoj površini ili u ekstracelularnom matriksu. VEGF-A izoforme koje su prekomjerno izražene u fiziološkoj te patološkoj angiogenezi su VEGF<sub>189</sub>, <sub>165</sub>, <sub>121</sub>. Homodimerizirani 189 je vezan predominantno za ekstracelularni matriks, dok su 121 i 165 uglavnom u solubilnom stanju. Već je spomenuto da sve izoforme VEGF-A stimuliraju endotelne stanice kroz vezanje na dva tirozin kinaza receptora VEGFR1 i VEGFR2. Strukturalna dimerizacija je osnovna za biološku aktivnost VEGF, posebno za 165 izoformu koja kao ligand ima najveći afinitet prema VEGFR2. Osim VEGF-A i ostali članovi VEGF familije mogu aktivirati ovaj receptor i izazvati proliferaciju, diferencijaciju i migraciju endotela te izraziti ulogu u promoviranju angiogeneze. VEGFR1 je pak aktiviran vezanjem VEGF-A i B te faktorom rasta deriviranim iz trombocita (PDGF) i omogućuje migraciju endotelnih stanica te organizaciju i stabilnost novostvorene vaskulature. VEGF također stimulira endotelne stanice na oslobađanje proteaza kao na primjer matriksnih metaloproteinaza koje degradiraju ECM i bazalnu membranu otvarajući prostor za migraciju endotela.(39).

Promjene u ekstracelularnom okolišu mogu podražiti stanice na lučenje VEGF-a. Ekstracelularni podražaji uključuju hipoksiju, hipoglikemiju, prisutnost inflamatornih citokina, PDGF, bazični fibroblastni čimbenik rasta, epidermalni čimbenik rasta, inzulinu

sličan čimbenik rasta. Mehanizmi koji stoje iza utjecaja različitih čimbenika rasta na proizvodnju VEGF-a i promociju angiogeneze su još uvijek nerazjašnjeni u potpunosti.

### **VEGF-A u odraslim tkivima**

Dokazano je da VEGF –A u odraslim tkivima služi kao faktor održavanja vaskulature jer njegov receptor VEGFR2 konstitutivno pokazuje fosforilirano stanje ukazujući pak indirektno na aktivnu signalizaciju VEGF-A. Ovaj čimbenik rasta dokazan je na proteinskom nivou imunohistokemijski u **mozgu** u području horioidnog pleksusa, olfaktornog bulbusa te cerebeluma uniformirano, dok se u području velikog mozga i moždanog debla nije našla tako široka rasprostranjenost. U malom mozgu VEGF se snažno eksprimira u Purkinjeovim stanicama, u području olfaktornog bulbusa se vidi u dva stanična sloja, a u horioidnom pleksusu se jača ekspresija nalazi u epitelnim stanicama koje direktno prekrivaju fenestrirani endotel. U sekretornim organima kao što su nadbubreg, slinovnice , gušterača, testis i prostata VEGF-A se nalazi u tkivno specifičnim stanicama. U **nadbubrežnoj žlijezdi** prisutan je u zoni glomerulozi i fascikulati kao i u sekretornim stanicama medule ali nije nađen u zoni retikularis. U **gušterači** je dokazan u Langerhansovim otočićima te u egzokrinom epitelu. U miješanim **slinovnicama** jače je eksprimiran u području više prokrvljenog seroznog dijela žlijezde nego u mukoznim acinarnim stanicama. U **testisu** se vidi u nakupinama Leydigovih stanica u intersticiju oko sjemenih kanalića, dok je u **prostati** uniformirano rasprostranjen u stanicama. Također je uniformirano prisutan u **skeletnom i srčanom mišiću** kao i u adipocitima s obzirom da se radi o visoko vaskulariziranim tkivima. U **bubregu** se vidi snažna ekspresija u glomerularnim podocitima koji su u kontaktu sa fenestriranim endotelom kapilare a nešto slabija ali široko rasprostranjena ekspresija je prisutna uglavnom u zavijenim kanalićima koji su u tijesnoj vezi s peritubularnim kapilarama. U **plućima** je ekspresija ograničena

na alveolarni epitel tipa II te epitel malih bronhiola. U **hepatocitima** koji tijesno surađuju sa sinusoidalnom vaskulaturom VEGF-A je široko rasprostranjen u svim regijama režnjica. U **velikim krvnim žilama**, a napose u aorti nađen je u mediji te u intimalnom sloju koeksprimirajući se u endotelu s receptorom VEGFR2 što sugerira autokrinu funkciju u ovom endotelu. Prema ovim istraživanjima niska ekspresija VEGF-A se nalazila u onim tkivima koja sadrže nepropusnu vaskulaturu koja i služi kao selektivna barijera kao što je moždano krvna ili krvno testikularna, a uopće se ne nalazi u avaskularnim tkivima kao što je kornea. Izrazito je eksprimiran u visoko vaskulariziranim tkivima, onim tkivima koja posjeduju propusni, fenestrirani endotel kapilara, odnosno sinusoidalni tip krvnih žila u bliskom kontaktu s parenhimalnim stanicama. Korelacija niskih nivoa VEGF ekspresije u slabo propusnoj vaskulaturi upućuje na ulogu ovog čimbenika u preživljavanju endotela dok je visoka ekspresija VEGF-A važna ne samo za preživljavanje i proliferaciju endotela nego i za održavanje propusnosti i fenestracije (40,41).

### **VEGF-A u bubregu**

Razvoj bubrega počinje kad ureteralni pupoljak invadira u metanefrički mezenhim i inducira njegovu diferencijaciju prema strukturama zrelog nefrona. Morfološki ovaj tip mezenhima se sastoji od vretenastih stanica široko rasprostranjenih u obilnom ekstracelularnom matriksu. Instruirane od pupoljka putem različitih molekula ove stanice se okupljaju i diferenciraju u epitelne stanice nefrona. Mehanizmi razvoja vaskularnih i stromalnih kao i glatko mišićnih stanica se intenzivno istražuju (42). Neki autori su našli da renalna vaskularna mreža nastaje invazijom egzogenih vaskularnih stanica koje prate ureteralni pupoljak za vrijeme invazije u metanefrički mezenhim što bi značilo da se vaskularne strukture u bubregu razvijaju angiogenezom iz okoline (43,44). Drugi autori su

otkrili diskretnu populaciju stanica u metanefričkom mezenhimu pozitivnih na VEGF receptor sugerirajući prisutnost prekusora endotelnih stanica u metanefričkom mezenhimu prije nego što su endotelne stanice detektirane u toj sredini (45). To bi značilo da se možda neke vaskularne strukture kao na primjer renalna arterija i njeni veći ogranci razvijaju angiogeneзом, a glomerularno kapilarno klupko te peritubularne kapilare vaskulogeneзом (42). Posebno je složena i pod lupom istraživanja vaskulogeneza specijalizacija krvnih žila. Zna se da su arterio-venski raspored i specijalizacija genetski određeni i kompletirani prije početka rada srca što bi značilo da tok krvi ne određuje karakter krvne žile kako se prije mislilo (10). Specijalizirane vaskularne strukture ovise o mikro okolišu unutar kojega lokalno, mehanički ili biokemijski faktori kontroliraju stanične spojeve koji su bitni za nastanak i sazrijevanje kontinuiranih, diskontinuiranih ili fenestriranih kapilarnih prostora. U bubregu je za razvoj vaskulature za vrijeme embrionalnog razvoja potreban VEGF koji zajedno sa svojim receptorom inducira i održava fenestracijski tip endotela i regulira vaskularnu propustljivost. Bubrež se formira kao sustav mikrovaskularnih jedinica nefrona i sastoji se od aferentne arteriole koja se nastavlja u kapilarno klupko, zatim eferentne arteriole koja se pak nastavlja u peritubularno kapilarno korito. Za vrijeme nefrogeneze avaskularni renalni mezenhim eksprimira VEGFmRNA dok podociti i epitelne stanice sabirnih kanalića ekspimiraju VEGFmRNA u kasnijim razvojnim fazama. Također se na početku nefrogeneze u nediferenciranom metanefričkom mezenhimu nalaze receptori za VEGF 1 i 2 koji omogućuju vaskulogenezu i kasnije se ekspimiraju na endotelu glomerula i oko tubula podržavajući angiogenezu. Kontinuirana visoka konstitutivna ekspresija VEGFR-a u endotelu glomerula i ekspresija VEGF-A u podocitima induciraju i održavaju fenestrirani fenotip endotela. Ovakav endotel omogućuje filtraciju, sekreciju i absorpciju. Visok nivo ekspresije VEGF-A održava se u podocitima te VEGFR-a u glomerularnom

endotelu i u odraslom dobu te se zajedno sa endokrinim žlijezdama, crijevu, plućima i u bubregu nalazi visoka ekspresija ovog citokina (46,47).

Razina ekspresije VEGF-A i VEGFR u odraslom dobu ukazuje na činjenicu da je nivo VEGF-a povezan sa visokom propusnošću endotela u bubregu iako nikada nije dokazano da direktno zaista utječe na glomerulalnu filtraciju. Također se eksprimira u renalnim tubularnim stanicama i to u distalnom epitelu više nego u epitelu proksimalnih kanalića te u sabirnim kanalićima u meduli. VEGF je dokazan u mezangiju samo u eksperimentalnim modelima te in vitro, a također sudjeluje u određivanju sastava glomerularne bazalne membrane.

Cijeljenje u eksperimentalno izazvanim glomerularnim oštećenjima posredovano je angiogenezom i hipotetski rekapitulira razvojni model. Na mjestima proliferacije endotelnih stanica u svrhu cijeljenja nalazi se povišena produkcija VEGF-a te fibroblastni čimbenik rasta ( iz engl. Fibroblast growth factor, FGF). Ovaj angiogeni čimbenik je potentan vazodilatator kroz djelovanje na sintezu NO, pa indirektno može imati utjecaj na pojačanu ekstravazaciju makromolekula kroz glomerulanu bazalnu membranu. Neki od radova pružaju dokaze da je visoka razina VEGF-a u serumu udružena sa mikroalbuminurijom. Čini se mogućim da VEGF potiče cijeljenje kod akutnih i minimalnih oštećenja nefrona kada je povišen u koncentraciji. Progresivna oštećenja i uznapredovala bolest bubrega prema mnogim studijama povezana su sa reduciranim nivoima VEGF-a. Imunolokalizacija VEGF-a u studijama na humanom materijalu brojnih bubrežnih oboljenja kao na primjer kod uznapredovale trombotske mikroangiopatije, tubulointersticijskog oštećenja u tijeku ureteralne obstrukcije ili kod kroničnog bubrežnog zatajenja je pokazala smanjenu ekspresiju ili potpuno odsustvo VEGF-a u tkivu. Nekoliko grupa autora pokazalo je da smanjena ekspresija VEGF-a u bubrežnom tkivu koincidira s infiltracijom upalnih stanica citokina IL1beta, IL6 i TNFalfa



koji inhibiraju ekspresiju i sekreciju VEGF-a u tubularnim stanicama, a može biti povezana i sa razvojem intersticijalne fibroze. S druge strane parenteralna administracija VEGF-a povećava perfuziju tkiva i stvaranje kolaterala što se može iskoristiti u transplantaciji organa, liječenju malformacija bubrega ili stečenih progresivnih bolesti bubrežnog parenhima . Da li se ovakva terapija zaista može optimalno iskoristiti ostaje izazov (48,49).

### **1.3.2.VEGF C i D**

Dva druga člana VEGF familije koja su strukturalno i funkcionalno povezana također su ključni u angiogenezi . VEGF-C i VEGF-D imaju centralnu domenu homolognu s VEGF-A ali se razlikuju po prisutnosti propeptida na krajevima. Dok jedne studije tvrde da je VEGF-C ekspresija stimulirana putem faktora rasta kao što su čimbenik rasta deriviran iz trombocita te epidermalnim čimbenikom rasta a ne hipoksijom (50,51). Druge dokazuju da hipoksija povećava broj transkripata koji kodiraju VEGF-C i D te njihov receptor u endotelnim stanicama vena (52). N-terminalni i C-terminalni kraj se proteolitički procesuiraju da bi se proizveo protein sa visokim afinitetom za VEGFR2 i VEGFR3 . VEGF-C inducira mitogenezu i migraciju endotelnih stanica te je odgovoran za preživljenje limfatičnog endotela. Za vrijeme razvoja VEGF-C ispoljenost je prisutna zajedno sa VEGFR3 receptorom i to pretežno u regijama razvoja limfnih žila i mezenterija. Istraživanja su pokazala da potpuni nedostatak ovog čimbenika uzrokuje prenatalnu smrt zbog akumulacije tekućine u tkivima miša kojima nedostaju limfne žile. Limfatični prostori se razvijaju samo pod utjecajem djelovanja VEGF-C i VEGF-D ukazujući na specifičnost vezanja za VEGFR3. Ova istraživanja dokazuju da je VEGF-C ključni parakrini čimbenik rasta za razvoj limfatične vaskulature ali ne i neophodan za razvoj krvnih žila. Neki eksperimenti ukazuju da je sama koncentracija VEGF-C ključna

u razvoju limfne vaskularne mreže (53,54). Studije međutim pokazuju da su VEGF-C i D važni u međustaničnoj signalizaciji u procesu angiogeneze i u odraslih, moguće regrutirani u procesu već potaknute angiogeneze putem VEGF-A. Štoviše, interakcija VEGF-C/VEGFR-3 može predstavljati alternativan, odvojeni put angiogene stimulacije (55). U tumorima VEGF C ekspresija korelira sa peritumoralnom limfangiogenezom te metastazama u limfne čvorove vjerojatno putem upalnih stanica koje eksprimiraju ovaj angiogeni čimbenik što još treba dokazivati (56).

### **1.3.3.VEGF-A u tumorima**

Već je rečeno da je VEGF-A jedan od najvažnijih angiogenih faktora koji sudjeluju u ravnoteži angiogenih supstanci na koje se može utjecati. Mnogo studija je pokazalo da VEGF igra ključnu ulogu u tumorskom rastu i metastaziranju epitelnih tumora uključujući kolorektalni karcinom, karcinom dojke, pluća, grlića maternice, tumora vrata i glave te karcinom bubrežnih stanica.

Promjene u ekstracelularnom okolišu koje su česte u tumorima mogu izazvati prisutne stanice na otpuštanje VEGF-A. Promjene kao hipoksija, hipoglikemija, prisutnost inflamatornih citokina, te prisutnost brojnih faktora rasta kao što su PDGF, fibroblastni čimbenik rasta (iz engl fibroblast growth factor,FGF), epidermalni čimbenik rasta (iz engl epidermal growth factor EGF), inzulinu sličan čimbenik rasta (iz engl insuli like growth factor, IGF) različitim mehanizmima mogu regulirati prekomjernu ekspresiju VEGF-A.

Nekontrolirana stanična proliferacija u tumorima uzrokovana je serijom staničnih genetskih promjena, kao što je aktivacija onkogeni, inaktivacija tumor supresor gena, abnormalni odgovor na čimbenike rasta kroz promjenjene signalne puteve unutar stanice ( myc, erb-B/EGFR, met), promjene u regulaciji staničnog ciklusa (Ciklini D i E, p27, p53, pRb) ili kroz prevenciju apoptoze (p53, bcl 2). Svi ti događaji u stanicama mogu biti

poticaj na sekreciju ili prekomjernu ekspresiju VEGF–A (57). Nasuprot tome inaktivirani ili nestali tumor supresor gen VHL navodi tumorske stanice na produkciju ovog angiogenog čimbenika (58). U brojnim malignim tumorima VEGF-A igra multiplu ulogu u tumorskoj progresiji vežući se na receptore aktivira signalne kaskade koje učestvuju u angiogenezi i staničnoj migraciji te vaskularnoj propusnosti. Aktivira endotelne stanice koje oslobađaju matriksne proteaze sa degradacijom bazalne membrane krvnih žila i ekstracelularnog matriksa, a indukcijom antiapoptotičkog signala kao što je bcl2 i survivin štiti novostvorenu vaskulaturu od destrukcije. Kaotična vaskulatura u tumorima heterogeno perfundira tumorsko tkivo koje je hipoksično što paradoksalno potiče još jaču produkciju VEGF-A (59).

Nekoliko signalnih puteva koji reguliraju ekspresiju VEGF-a je identificirano u tumorskoj stanici, a neke od glavnih regulatornih spojeva koji induciraju ove signalne puteve uključili smo u ovu studiju. Slika 10. shematski je prikaz mogućih regulatornih puteva u ekspresiji VEGF-A (60).

**Slika 10. Model VEGF aktivacije putem hipoksije, onkogeni ili gubitkom tumor supresorskih gena, te putem čimbenika rasta**

prilagođeno iz Mukhopadhyay D, Datta K. Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. *Semin Cancer Biol.* 2004;14:123-30.(60)

#### **1.4. Hipoksijom pobuđeni čimbenik- 1 $\alpha$ ( HIF-1 $\alpha$ )**

**HIF-1 $\alpha$**  (od engl. hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ )

Aerobni metabolizam je značajan za multicelularni organizam naročito u sferi proizvodnje energije. Kada opskrba kisikom ne zadovoljava potrebe stanice za energijom uključuju se mehanizmi adaptacije koji kompenziraju poremećaj i omogućuju stanici urednu funkciju. Primarni mehanizam prilagodbe je transkripcijska regulacija čitave baterije gena koji

odgovaraju na hipoksiju. Najbolje proučeni mehanizam u ovom procesu je familija transkripcijskih čimbenika nazvanih čimbenici pobuđeni hipoksijom (HIF) sa cis-djelujućim elementom tj intra molekularnom DNA sekvencom nazvanom hipoksija odgovarajući element (engl hypoxia responsive element HRE) koji se nalazi na regulatornim regijama ciljnih gena. Mehanizam je prvo pokazan na genu eritropoetina čija je produkcija porasla više od 100 puta u uvjetima hipoksije putem HIF pobuđene transkripcije. Od tada je identificirano više od 70 ciljnih gena koji su direktno regulirani od strane HIF, a nekoliko stotina gena je direktno ili indirektno vezano za taj regulacijski mehanizam. Familija HIF pripada Per-ARNT-SIM (PAS) superfamiliji transkripcijskih čimbenika i karakterizirana je prisutnošću PAS domene koja kontrolira dimerizaciju. HIF je hetrodimerni protein koji se sastoji od  $\alpha$  i  $\beta$  podjedinica. HIF $\alpha$  je sastavljen od 3 podjedinice HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  i HIF-3 $\alpha$ .  $\beta$  podjedinica se sastoji aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) poznatog i kao HIF-1 $\beta$  te od ARNT2. Najkompletnije proučeni HIF je kombinacija HIF-1 $\alpha$  podjedinice i HIF-1 $\beta$  koji je glavni regulator odgovora na hipoksiju u stanicama sisavaca. Dok su ARNT (HIF-1 $\beta$ ) i ARNT 2 konstitutivni nuklearni proteini, ekspresija HIF-1 $\alpha$  je usko vezana za koncentraciju kisika u stanici. Vrlo brzo se akumulira u stanici nakon izlaganja hipoksičnim uvjetima, a isto tako brzo se i degradira na reoksigenaciju sa poluživotom kraćim od 5 minuta. Produžena HIF aktivacija može biti štetna za stanicu.  $\alpha$  podjedinica je izučavana intenzivno nekoliko zadnjih godina što je dovelo do identifikacije porodice hidrolaza koje modificiraju ovu podjedinicu u ovisnosti o statusu oksigenacije stanice. Tri hidroksilaze poznate kao proteini koji sadrže prolil hidroksilaza domenu kontroliraju HIF-1 $\alpha$  stabilnost. One modificiraju proline unutar degradacijske domene ovisne o kisiku unutar molekule HIF-1 $\alpha$  u uvjetima normalne oksigenacije. Hidroksilacija prolina je potrebna za interakciju HIF-1 $\alpha$  sa produktom tumor supresorskog gena von Hippel

Lindau ( pVHL). pVHL služi za prepoznavanje E3 ubiquitin ligaze koja vodi HIF-1 $\alpha$  ubiquitinaciji i proteosomalnoj degradaciji.

Hidroksilacija HIF-1 $\alpha$  u hipoksiji je inhibirana te dolazi do akumulacije HIF-1 $\alpha$  i posljedične indukcije aktivnosti ovoga spoja. Kada nivo kisika pada za oko 7 % dolazi do stabilizacije HIF-1 $\alpha$ . U stabilizaciji sudjeluju reaktivne vrste kisika (iz engl- reactive oxygen species ROS) koje nastaju u mitohondrijima uz pojačanje transkripcijske aktivnosti HIF-1 $\alpha$ . Stabilizirani HIF-1 $\alpha$  se translocira u jezgru gdje sa HIF- $\beta$  čini kompleks koji se veže za HRE na regulatornim regijama ciljnih gena aktivirajući i pojačavajući njihovu transkripciju (61,62, 63, 64, 65) (Slika 11). Hipoksija nije jedini mehanizam stabilizacije i aktivacije ovog spoja.

Gubitak funkcije pVHL vodi akumulaciji ovog spoja i za vrijeme normalne oksigenacije izazivajući konstitutivnu indukciju i transkripciju ciljnih gena, uključujući **VEGF**.

Ovakvo djelovanje izaziva stvaranje visoko vaskulariziranih tumora kao što su hemangioblastomi, angiomi te karcinomi bubrežnih stanica. Također, u bubrežnom karcinomu možemo prirodno naći HIF-1 $\alpha$  antisense mRNA (62). HIF-1 $\alpha$  posreduje i koordinira transkripcijsku aktivaciju cijelog metaboličkog puta glukoze od ulaska u stanicu do produkcije laktata pojačavajući ekspresiju čak 13 gena koji kodiraju transportere glukoze ili glikolitičke enzime. Tako sudjeluje u takozvanom Warburg efektu opisanom još prije 70 godina, a koji prepoznaje svojstvo tumorskih stanica da oksidativni metabolizam zamijeni glikolitičkim. Naime, tumorske stanice pod mitogenim utjecajem onkogeni više ATP-a dobivaju glikolizom nego oksidativnom fosforilacijom. Misli se da taj preokret nastaje da bi se reducirao nastanak reaktivnih kisikovih spojeva koji mogu oštetiti stanicu (66). U promotorima gena koji kodiraju glikolitičke enzime i transportere identificirani su HRE koji pak sadrže 3 vezna mjesta za HIF-1  $\alpha$ . Indukcija HIF-1 $\alpha$  ekspresije u stanicama stimuliranim faktorima rasta dovodi do promjene oksidativnog u

glikolitički put metabolizma. Ako je ta promjena ugrađena u program celularne proliferacije ne bi iznenadilo da praktički svaka tumorska stanica ispoljava Warburg efekt. Faktori rasta, kao što su EGF, FGF, IGF-1, interleukin 1 $\beta$ , PDGF, tumor nekrotizirajući čimbenik ( iz engl tumor necrosis factor, TNF $\alpha$ ) bez obzira na hipoksiju u stanicama induciraju pojačanu ekspresiju HIF-1 $\alpha$  proteina te pojačanu veznu aktivnost HIF-1 $\alpha$  DNA za HRE sekvencu VEGF-A i ostalih angiogenih faktora koji posjeduju HRE (67). Normalan metabolizam HIF-1 $\alpha$  u uvjetima novonastale hipoksije vidi se na slici 11. (68).

#### **Slika 11. HIF 1 metabolički put**

U normalnim uvjetima HIF-1 $\alpha$  postranslacijski modificira prolihdroksilacijom pomoću pVHL koji tako priprema HIF-1 $\alpha$  za ubikvitin posredovanu degradaciju. U hipoksiji dolazi do stabilizacije u citoplazmi fosforilacije i prijelaska u jezgru gdje se dimerizira sa HIF-1 $\beta$  i uz koaktivator CBP/p300 veže na hipoksija odgovorne elemente da bi se aktivirala transkripcija ciljnih gena. Preuzeto Margaret Ashcroft (Shutting down blood supplies to tumours Cancer biology-drug discovery, annual report [www/icr.ac.uk/annual\\_research\\_report](http://www/icr.ac.uk/annual_research_report) (68)

Pregled aktivnosti HIF-1 $\alpha$  u hipoksičnim uvjetima kod neregularne stanične proliferacije u tumorigenezi daje slika 12. (69).

#### **Slika 12. HIF1 $\alpha$**

može biti stabiliziran preko hipoksije ali i kroz različite signalne puteve onkogeni i transkripcijskih faktora te posljedično utječe na angiogenezu, staničnu proliferaciju te metaboličku adaptaciju (prilagođeno od : Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy . Nat Rev Cancer 2003;3(10):721-723 (69).

### **1.5. Receptor epidermalnog čimbenika rasta (EGFR)**

Uloga čimbenika rasta u patogenezi humanih tumora dugo je poznata. Još prije 20 godina Sporn i Roberts (70) su postavili teoriju autokrine sekrecije u kojoj tumorske stanice općenito zahtijevaju manju količinu čimbenika rasta za održavanje visokog stupnja proliferacije. Uočeno je da tumorske stanice obilno produciraju faktore rasta potaknute vlastitim citoplazmatskim tirozin kinaza mehanizmom. Različite porodice čimbenika rasta su involvirane u autonomnom rastu tumora. Među njima receptor epidermalnog

čimbenika rasta (iz engl. epidermal growth factor receptor, EGFR) te peptidni epidermalni čimbenik rasta (EGF) imaju centralnu ulogu u patogenezi i progresiji različitih malignih tumora. EGF ligand /receptor također je uključen u rani embrionalni razvoj, obnovu matičnih stanica u normalnim tkivima kao što su koža, crijevo, jetra. Receptor epidermalnog čimbenika rasta je član familije Erb receptora subfamilije od četiri bliska tirozin kinaza receptora: EGFR (ErbB-1) HER2/c neu (ErbB-2) , Her3 (ErbB-3) i Her4 (ErbB-4). Ovi proteini imaju EGF-u sličnu domenu sastavljenu od 3 intramolekularne grupe vezane disulfidnim vezama uz dodatni strukturni motiv koji određuje veznu specifičnost kao što je domena slična imunoglobulinima, heparin vezno mjesto ili vezno mjesto glikozilacije. S obzirom na specifičnost vezanja na Erb receptore EGF i s njim povezani čimbenici rasta se mogu podijeliti u tri skupine :

1. grupa uključuje EGF, transformirajući čimbenik rasta  $\alpha$  ( TGF  $\alpha$  ) i ampregulin (AR) koji se specifično vežu samo na EGFR
2. grupa su betacelulin, heparin vežući čimbenik rasta i epiregulin koji iskazuju dvojnu specifičnost vežući se za EGFR i ErbB-4
3. grupa su neuregulini koji se vežu na ErbB-3 i ErbB-4 ili samo na ErbB-4. Niti jedan od peptida iz familije EGF se ne veže na ErbB-2.

Vežući se na receptor na staničnoj površini stimuliraju aktivnost protein kinaze u području unutrašnje domene receptora (71). Pobuđena aktivnost tirozin kinaze izaziva signalnu transdukcijsku kaskadu koja rezultira brojnim biokemijskim promjenama u stanici kao što su povišenje nivoa staničnog kalcija, povećanje glikolize, sinteza proteina. Također izaziva i povećanje ekspresije gena uključujući i ekspresiju samog EGFR (auto ili parakrina sekrecija) što na kraju vodi sintezi DNA te staničnoj proliferaciji. Mutacije koje utječu na EGFR ekspresiju i aktivnost mogu dovesti do nastanka karcinoma i utjecaja na

celularne regulatorne mehanizme rasta, diferencijacije, angiogeneze i preživljavanja tumora. Receptor za epidermalni čimbenik rasta prikazan je na slijedećoj shemi (slika 13).

### **Slika 13. EGF receptor**

(prilagođeno od: Wells A. EGF receptor. Int J Biochem Cell Biol. 1999;31(6) :637-643)(71)

Kaskada intracelularnih događaja nakon stimulacije receptora uključuje aktivaciju ras/raf/MEK/MAPK i PI3 puta što je prikazano na slijedećoj shemi.(72)

### **Slika 14. Signalni put EGFR**

(prilagođeno od: Venook AP. Epidermal growth factor receptor-targeted treatment for advanced colorectal carcinoma. Cancer.2005;103:2435-2446) (72)

Različite studije pokazuju da in vitro i in vivo prekomjerna ekspresija EGFR i ErbB-2 uzrokuju tumorsku transformaciju stanica. Uočeno je da je transformacija stanica potaknuta EGFR ovisna o egzogenom EGF dok je transformacija inducirana sa ErbB-2 direktno vezana za overekspresiju onkogeni i ne treba vanjski ligand. Prognostički značaj EGFR i ErbB2 istraživani su u brojnim studijama. Iako rezultati istraživanja govore da je prekomjerna ispoljenost ovih receptora povezana sa lošijom prognozom konačne potvrde da ovi receptori neovisno predviđaju ishod bolesti još uvijek nema. Neke studije su pokazale da EGFR definira subgroupu tumora s lošijom prognozom koji ulaze u relaps već nakon 1 do 2 godine. Za ErbB-2 nema više sumnje da su amplifikacija gena i/ili prekomjerna ekspresija proteina povezani sa lošijom prognozom i metastatskim karcinomom dojke što se danas uvelike koristi u predviđanju individualne prognoze bolesti. Važno je naglasiti da se u humanim tumorima zbog visoke frekvencije pojavljivanja pojedinačnih ErbB receptora na membrani tumorskih stanica javlja i koekspresija različitih tipova ovih receptora u većini tumora. Ovaj fenomen može biti važan za patogenezu i progresiju tumora jer je nađeno da koekspresija različitih formi



ErbB receptora korelira sa lošijim ishodom bolesti to jest s agresivnijim fenotipovima tumora. Također je u tumorima dojke nađeno da najkraće prežive pacijenti s tumorima koji koeksprimiraju ErbB2 i EGFR što bi značilo da in vivo postoji veza između ekspresije EGFR i aktivacije ErbB-2 receptora ne samo u tumorima dojke već i u tumorima pluća, karcinomima debelog crijeva, tumorima prijelaznog epitela mokraćnog mjehura te oralnih pločastih karcinoma. Mnoge studije ukazuju da je koekspresija EGF-u sličnih peptida, odnosno različitih liganada koji se vežu na mrežu ErbB receptora uključena u progresiju tumora što ima važnu ulogu u određivanju prognoze i razvoju terapije koja mora biti usmjerena na blokadu različitih tipova receptora. Takva terapija polučuje značajniji uspjeh od blokade samo jednog od tipova ovih receptora. Najčešća genska alteracija koja rezultira prekomjernom ekspresijom EGFR je amplifikacija premda su studije Normana i suradnika 2003. pokazale da prekomjerna ispoljenost ovog receptora i ne mora biti povezana s amplifikacijom gena pa očito postoje i drugi mehanizmi koji potiču ekspresiju. Diskordantni rezultati su uočeni kod izučavanja odgovora na terapiju kod tumora sa amplifikacijom i visokom polizomijom te mutacijama u tirozin kinaza domeni ovog receptora. Tumori koji dobro odgovaraju na terapiju signifikantno koreliraju sa ovim mutacijama i boljom prognozom dok tumori koji imaju dodatne mutacije, izbjegavaju kontrolne mehanizme i rezistentni su na terapiju (73).

### **1.5. EGFR i VEGF**

Studije Sini i autora na eksperimentalnim modelima in vitro pokazale su da inhibicija EGFR je blokira oslobađanje VEGF-A iz tumorskih stanica te proliferaciju i tumorskih i endotelnih stanica. Kod in vitro izazvane angiogeneze EGF je stimulirao lučenje VEGF-A od strane glatkih mišićnih stanica što je rezultiralo povećanom angiogenezom. U stanjima

ograničenog stvaranja VEGF, EGFR preuzima važnu ulogu proliferacije, preživljenja i nastanka novih izdanaka krvnih žila. (74).

Nadalje, EGF inducira nastanak cjevčica u kulturama humanih mikrovaskularnih endotelnih stanica i pospješuje migraciju humanih endotelnih stanica umbilikalne vene u prisutnosti VEGF-A. Kada tumorske stanice izrazito eksprimiraju EGFR okolne povezane endotelne stanice eksprimiraju aktivirane forme EGFR. U kulturi stanica različitih tumorskih tipova aktivacija EGFR puta inducira produkciju VEGF-A. U mišjim ksenograft modelima inhibicija EGFR dovodi do smanjenja gustoće krvnih žila, apoptoze endotelnih stanica te smanjene produkcije VEGF-A (75). Stoga, simultana blokada VEGF i EGFR signalnih puteva rezultira antitumorskim efektom upućujući na ovu kombinaciju kao dobru terapijsku strategiju.

## **1.6. p53**

p53 također znan kao protein 53, tumor protein 53, je transkripcijski čimbenik, a kodira ga TP53 gen. p53 je važan u multicelularnim organizmima gdje kao tumor supresor gen regulira stanični ciklus prevenirajući nastanak tumora. Zbog toga ga nazivaju čuvarom genoma, anđelom čuvarom gena ili glavnim paziteljem (engl. watchman) naglašavajući tako njegovu ulogu u očuvanju stabilnosti genoma sprječavanjem mutacija (76). Slika 15. prikazuje djelovanje p53 proteina.

### **Slika 15. Shema p53 djelovanja**

U normalnim stanicama p53 je inaktiviran putem negativnog regulatora mdm2. Aktivirani p53 inducira zastoj u staničnom ciklusu ili apoptozu. Kako i zašto izabire staničnu obnovu i preživljavanje ili programiranu staničnu smrt ostaje nejasno. (prilagođeno i preuzeto sa: Free encyclopedia- Wikipedia, Autor Thierry Soussi, 2007) (76).

Ime mu dolazi od molekularne mase, radi se o proteinu od 53 kDa. U ljudi TP53 gen se nalazi na kratkom kraku kromozoma 17 (17p13.1) i sadrži 393 aminokiseline i 7 domena. Mutacije koje deaktiviraju p53 u karcinomima obično se javljaju u centralnoj DNA – vezujućoj domeni. Većina tih mutacija onemogućava protein da se veže na njegovu ciljnu DNA sekvencu te tako prevenira transkripcijsku aktivaciju gena. Ove mutacije su po tipu recesivnog gubitka funkcije. Molekule sa mutacijama u domeni homo-oligodimerizacije vrše dimerizaciju sa "divljim tipom p53" i tako sprječavaju aktivaciju transkripcije. Tako, ove mutacije imaju dominantan negativan efekt na funkciju p53 (77). p53 ima mnoge mehanizme koji održavaju normalnu funkciju stanice i njezinu proliferaciju te ima centralnu ulogu u mnogim antitumorskim staničnim mehanizmima. Može aktivirati proteine koji popravljaju oštećenu DNA, zadržava stanični ciklus u G1/S fazi u slučajevima oštećenja DNA dovoljno dugo da mehanizmi za popravak DNA imaju vremena popraviti oštećenje, a stanici se tek tada dopušta nastavak ciklusa dijeljenja. Ako je prepoznato oštećenje nemoguće ispraviti p53 može pokrenuti apoptozu, odnosno programiranu staničnu smrt. Ova molekula je u normalnoj stanici inaktivna, vezana za MDM2 (engl. Murine Double Minute) koji inhibira transkripcijsku aktivnost ovog proteina i promovira njegovu degradaciju ponašajući se kao ubiquitin ligaza. Aktivira se nakon djelovanja agenasa koji uzrokuju DNA oštećenje, a ono se prepoznaje na kontrolnim točkama unutar staničnog ciklusa sa indukcijom fosforilacije p53 proteina. Aktivna forma p53 inhibira djelovanje brojnih gena važnih u tranziciji stanice iz G1 u S fazu i kontrolira gensku stabilnost. Mutirani p53 ne veže se propisno na DNA pa proteini inhibitori staničnog ciklusa nisu više dostupni. Tako, oštećena stanica kreće nekontrolirano u nove cikluse dijeljenja pa može nastati tumor. Istraživanja su pokazala da je p53 usko povezan sa drugim supresorom genoma, Retinoblastoma (Rb) genom, s obzirom da im se putevi aktivacije i djelovanja u stanici dijelom preklapaju oni se mogu međusobno regulirati

(78). p53 postaje aktivan kao odgovor na DNA oštećenje, oksidativni stres, osmotski šok, depleciju ribonukleotida ili onkogenu ekspresiju. Aktivacija p53 se sastoji od dva glavna događaja. Prvo, poluživot p53 proteina drastično se produžuje sa brzom akumulacijom ovog proteina u pogođenoj stanici. Drugo dolazi do konformacijske promjene molekule koja prisiljava p53 da aktivno sudjeluje u transkripcijskoj regulaciji u stanicama. Kritični događaj koji vodi aktivaciji molekule p53 je fosforilacija N-terminalne domene koja sadrži brojna vezna mjesta za fosforilaciju koja se smatraju primarnim ciljnim mjestima za stres signale provođene protein kinazama. U stanicama koje funkcioniraju u normalnim uvjetima nivo p53 proteina održava se niskim kroz kontinuiranu degradaciju. Već spomenuti MDM2 protein se veže na p53, transportira iz jezgre u citosol gdje podliježe proteasomalnoj degradaciji. U negativnoj povratnoj sprezi p53 inducira MDM2 te se uspostavlja ciklus kontinuirane produkcije i degradacije. Fosforilacija N-terminalnog kraja p53 putem protein kinaza kao i dodatna promjena konformacije oštećuje vezanje p53 i MDM2. Acetilacijom karboksi-terminalnog kraja putem transkripcijskih koaktivatora otkriva se DNA domena sa veznim mjestima dopuštajući aktivaciju ili represiju pojedinih gena. Deacetilacijom p53 inhibira se apoptoza. Oštećenje TP53 gena dovodi do izrazite redukcije tumorske supresije. Ljudi koji su naslijedili samo jednu funkcionalnu kopiju gena razvijaju brojne tumore već u ranom djetinjstvu u sklopu bolesti poznatoj kao Li Fraumeni sindrom. Više od 50% tumora pokazuju mutacije ili delecije TP53 gena koji tada kodira mutant p53 protein. Ovakav p53 ne inducira proizvodnju MDM2 proteina u negativnoj povratnoj sprezi pa dolazi do akumulacije proteina u visokim koncentracijama bez funkcionalnog efekta. Štoviše mutantni p53 može inhibirati produkciju normalnog p53 proteina pa nema kontrole proliferacije te nastaju tumori.. U terapiji, restauracija endogene funkcije p53 daje obećavajuće rezultate.(79,76,80)

Gubitak funkcije p53 može doprinijeti i u tumorskoj angiogenezi kroz forsiranu HIF-1 $\alpha$  ekspresiju u uvjetima hipoksije, što opet, pobuđuje transkripcijsku aktivnost VEGF gena i proizvodnju VEGF proteina sa posljedičnom indukcijom vaskularizacije (60).

Inhibicija tumorske angiogeneze pokazala se kao obećavajući pristup liječenju maligne bolesti. Iako je ovaj koncept predložen još prije tri dekade, razumijevanje molekularnih događaja koji su odgovorni za razvoj i rast tumorske vaskulature još nisu do kraja razjašnjeni. Veliki broj prekliničkih i kliničkih studija koje razvijaju antiangiogenu terapiju koriste karcinom bubrežnih stanica kao idealan model za evaluaciju novih strategija zbog njegove bogate vaskularizacije i visoke ekspresije angiogenih čimbenika kako u tumoru tako i u serumu pacijenata (81)

Tako se i naše istraživanje regulatornih mehanizama angiogeneze i VEGF-a bazira na humanom modelu svjetlostaničnog karcinoma bubrega.

## **1.7. KARCINOM BUBREŽNIH STANICA**

Karcinom bubrežnih stanica (KBS) javlja se u oko 2-3% svih karcinoma s porastom prevalencije u Evropi i Sjevernoj Americi (82). U grupi urogenitalnih tumora dolazi na treće mjesto s prosjekom od 9 novootkrivenih na 100000 godišnje. U SAD se godišnje otkrije oko 30000 novih bolesnika, dok je broj u Europskoj zajednici oko 20000 (83). U Republici Hrvatskoj je 2002. godine otkriveno 556 novih slučajeva. (84).

Na našem Zavodu učestalost dijagnoze KBS u desetogodišnjem razdoblju varira ali se na slici 16. vidi porast novootkrivenih slučajeva (85) .

### **Slika 16. Frekvencija pojavljivanja biopsija sa dijagnozom KBS**

u razdoblju od 1993-2002 na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.( Đorđević G, Sinožić E, Peitl V, Mustać E. Patologija u urologiji. Medicina 2003;(85)

RCC predstavlja oko 3% svih tumora u odrasloj dobi, a zabilježeno je povećanje incidencije veće od 30% (godišnji rast 2,3-4,3%) u posljednja 2 desetljeća što se objašnjava široko rasprostranjenom uporabom dijagnostičkih, tzv. »imaging« metoda: ultrazvuk (UZ), kompjutorizirana tomografija (CT), nuklearna magnetska rezonancija (NMR). Klasični trijas simptoma: bol u lumbalnoj regiji, makrohematurija i palpabilna masa, danas se susreću u manje od 10% bolesnika (83,86).

Na velikim studijama prosječno ukupno petogodišnje preživljavanje je oko 60%, što ovisi o stadiju. Prema TNM klasifikaciji 90-100% pacijenata sa tumorom otkrivenim u stadiju I preživljavaju 5 godina, 74-96% sa tumorima u II stadiju, te 59-70% sa tumorima u stadiju III. Petogodišnje preživljenje pacijenata sa tumorima u IV stadiju se drastično smanjuje na 16-32%.

Odnos spolova oboljelih od karcinoma bubrežnih stanica je 3:2, s muškom predominacijom. Prema dobi najčešća pojavnost je od druge polovice petog do sedmog desetljeća života. Najniža incidencija je zabilježena u Azijskim zemljama, slijede SAD i Kanada, dok je najviša prisutna u nekim državama srednje Europe (87).

Nekoliko mogućih rizičnih čimbenika povezano je s povećanim pojavljivanjem KBS. U prvom redu to je pušenje (88). Debljina tj. «indeks tjelesne mase» (iznad četvrte kvartile) naročito kod žena, utječe na povećanu učestalost KBS i to direktnim povećanjem endogenog estrogena, a povećava se i bioraspoloživost faktora rasta slobodnog inzulina koji može utjecati na karcinogenezu. Kao mogući čimbenik rizika spominje se i hipertenzija te uporaba nekih antihipertenzijskih lijekova tijazidske skupine. Česti kontakti sa željezom, naftom, azbestom i kadmijem mogu također biti uzročni čimbenici (89). Ishrana se navodi kao jedan od ponekad presudnih čimbenika u stvaranju karcinoma, prvenstveno prženi mesni proizvodi, dok se voće i povrće spominju kao zaštitni čimbenici (vitamin E i karotenoidi) (90,91). U bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrega, pri čemu

je uzrok stečena cistična bolest bubrega kod pacijenata na dijalizi, primjećena je veća incidencija KBS (92).

Razvoj molekularne genetike u okviru biologije i imunobiologije doveo je do spoznaje o familijarnim oblicima KBS. Genetske anomalije koje dovode do razvoja novotvorine posljedica su: inaktivacije tumorskih supresorskih gena, aktivacije onkogeni i poremećaja u procesu obnavljanja DNA. Upravo je određivanje genotipa u skladu s morfološkim karakteristikama dovelo do današnje WHO klasifikacije (93,94)

WHO KLASIFIKACIJA KARCINOMA BUBREŽNIH STANICA (2003):

- svijetlostanični tip  
*multilokularni cistični karcinom*
- papilarni tip
- kromofobni tip
- karcinom sabirnih kanalića Bellini
- medularni karcinom  
*karcinomi vezani uz Xp11.2 translokaciju/fuziju TFE gena*  
*karcinom vezan uz neuroblastom*
- mucinozni, tubularni i karcinomi s vretenastim stanicama
- neklasificirani karcinomi

Nasljedne forme mogu histološki biti tumori svjetlih stanica, papilarni, kromofobni i onkocitom. VHL sindrom je obiteljski oblik svijetlostaničnog karcinoma bubrežnih stanica (SSKBS). To je autosomno-dominantni poremećaj koji se zamjećuje u 1 na 40000 živorođene djece. Genetska promjena jest defekt na kratkom kraku kromosoma 3 (3p25-26) pri čemu je tumor supresorski gen u potpunosti razdvojen (95). Povezan je s drugim vaskularnim tumorima po tijelu (retinalnim hemangiomom, hemangioblastomom u centralnom živčanom sustavu), feokromocitomom, adenokarcinomom i cistom gušterače te epididimalnim cistadenomom. Vjerojatnost nastanka SSKBS do 7. desetljeća života je kod VHL sindroma čak 70%. Također se dokazala i povećana incidencija SSKBS -a u

dobi do 35 godine života, uz učestaliju bilateralnost i multifokalnost. Metastatski SSKBS je najčešći uzrok smrti u VHL bolesti (96). Drugi oblik nasljednog karcinoma svijetlih stanica je familijarni SSKBS. Opisano je nekoliko bolesnika s KBS u kojih je pronađena translokacija na 3p14 kromosomu (97).

KBS nastaje u zreloj tubularnoj strukturi bubrega. Većina ih je porijekla iz stanica proksimalnog tubula, dok se za kromofobni i tumor sabirnih stanica smatra da su porijekla donjeg nefrona, odnosno sabirnih kanalića (98).

Patohistološki nalaz sadržava uz histološki tip i nuklearni gradus koji se pokazao kod svijetlostaničnog i papilarnog karcinoma kao neovisni prognostički čimbenik. U širokoj primjeni je Fuhman sustav gradiranja prema izgledu jezgara od 1-4 (99).

Mikroskopski stadij tumora, jedan od najvažnijih prognostičkih čimbenika, neovisan je o histološkom tipu. Koristi se u TNM klasifikaciji unutar koje se uz opis standardnih struktura, kapsule bubrega, nadbubrega, Gerota fascije, masnog tkiva i struktura hilusa preporuča točno označiti mjesto proboja tumora u perirenalno masno tkivo, te invaziju mikrovaskulature (94).

#### TNM KLASIFIKACIJA

##### T: Primarni tumor

Tx/pTx: primarni tumor nije nađen

TO/pTO: bez znakova primarnog tumora

T1/pT1: tumor veličine do 7 cm, ograničen na bubreg

T1a/pT1a: tumor veličine do 4 cm, ograničen na bubreg

T1b/pT1b: tumor veći od 4 cm, ali manji od 7 cm, ograničen na bubreg

T2/pT2: tumor veći od 7 cm, ograničen na bubreg

T3/pT3: tumor proširen u glavnu venu (vene) ili zahvaća nadbubrežnu žlijezdu ili perinefritičko tkivo ne prelazivši Gerotinu kapsulu



T3a/pT3a: tumor zahvaća nadbubrežnu žlijezdu ili perinefritičko tkivo, ali ne izvan Gerotine kapsule,

T3b/pT3b: tumor se širi u renalnu venu (vene) ili donju šuplju venu ispod ošita,

T3c/pT3c: tumor se nalazi unutar donje šuplje vene iznad ošita

T4/pT4: tumor prodire izvan Gerotine kapsule

N: regionalni limfni čvorovi (hilarni, abdominalni paraaortalni i parakavalni čvorovi)

Nx: regionalni čvorovi se ne nalaze

NO: bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima

N1: metastaza u jednom regionalnom limfnom čvoru

N2: metastaze u više od jednom regionalnom limfnom čvoru

M: udaljene metastaze

MX: udaljene metastaze se ne nalaze

MO: bez udaljenih metastaza

M1: prisutne udaljene metastaze

Osim navedenih standardnih prognostičkih čimbenika u literaturi se navode još:

**Mikrovaskularna invazija** korelira s progresivnošću tumora, nije se pokazala neovisnim čimbenikom (100), dok je uloga angiogeneze i dalje u fokusu istraživanja.

**DNA ploidija** -DNA citometrijom je moguće odrediti količinu DNA u tumorskim stanicama, te identificirati tumore s diploidnim odnosno aneuploidnim staničnim sastavom. Aneuploidni tumori mogu biti povezani sa slabijim preživljenjem.(101) .

**PCNA** (antigen proliferacije staničnih jezgara) kojega povišena razina može značiti slabiju prognozu (102)

**Mitotski indeks** koji je povišen u agresivnijih oblika tumora (102).

**Ki67 (MIB-1)** -jezgrin antigen povezan uz proliferaciju i prisutan je u svim fazama umnožavanja ljudskih stanica. U radovima se opisuje njegov značaj kao izdvojenog prognostičkog čimbenika, (103).

**Stanična morfometrija** se temelji na hipotezi o veličini jezgre kao parametru veće količine DNA , povezana je sa stupnjem i gradusom tumora (104) .

**p53** se pokazao mogućim prognostičkim čimbenikom u mnogih tumora ali kod SSKBS to nije slučaj (103)

**Bcl-2, mdm-2, c-myc i ras onkogeni** – čija ispitivana prognostička vrijednost nije dala značajnijih rezultata, (105)

**Čimbenici rasta EGFR** (receptor epidermalnog faktora rasta) i **alfa TGF** (čimbenik tumorskog rasta) povezani su s progresijom tumora i angiogenezom (75).

Od čimbenika vezanih **uz bolesnika** izdvajaju se:

**vrijeme otkrivanja bolesti** (s novim „imaging“ metodama broj slučajnih nalaza dosegao je u pojedinim studijama i 60%),

**laboratorijski nalazi krvi** (pad hemoglobina, trombocitoza, povišena alkalna fosfataza, gama GT, interleukin 6 , CA 125, eritropoetin)

**nasljedne bolesti, naročito Von Hippel-Lindau-ova** (95)

Čimbenici vezani uz **tip liječenja**:

**radikalna nefrektomija** je i dalje „zlatni standard“, iako je uloga adrenalektomije i limfadenektomije kontroverzna,

radikalna operacija uz **adjuvantnu imunoterapiju** kod uznapredovale bolesti pokazala se boljim prognostičkim čimbenikom od imunoterapije same

Kirurška terapija s odstranjenjem tumora u ranom stadiju može značiti izlječenje, ali nema efektivne terapije koja bi spriječila relaps bolesti nakon zahvata. Obično se na tri pacijenta javlja jedan koji se prezentira s metastatskom bolešću ili razvija metastaze kasnije, što

rezultira smrtnim ishodom. Citotoksična kemoterapija te imunoterapija uglavnom su neefikasne pa su hitne kliničke potrebe potaknule istraživanja za razvoj novih terapijskih pristupa ovom tumoru, napose u sferi antiangiogene terapije (106). U današnje vrijeme je nekoliko anti-angiogenih agenasa samih ili u kombinaciji s drugim konvencionalnim terapijama već u fazi kliničkog ispitivanja koje se bazira na obećavajućim predkliničkim studijama. Kliničke strategije usmjerene na blokadu proangiogenih faktora, aplikaciju antiangiogenih čimbenika odnosno uništavanje novostvorene tumorske vaskulature nazivaju se ciljna biološka terapija.

Od svega se naintenzivnije proučava VEGF, a antiangiogeni lijekovi su uglavnom blokatori VEGF ligand-receptor sustava. Već je spomenuto da su pretklinička istraživanja Jain i suradnika pokazala da blokada VEGF-a i njegovog signalnog puta predstavljena Avastinom i malim molekulama inhibitorima tirozin kinaza receptora, dovode do morfološke i funkcionalne «normalizacije» tumorske vaskulature (107). U SSKBS koji prekomjerno ekspimiraju VEGF kliničke studije su pokazale skromne rezultate u preživljavanju pacijenata iako su u kombinaciji s drugom standardnom terapijom ovi lijekovi dali daleko bolje rezultate u liječenju tumora dojke i kolona. Kombinacija blokatora EGFR i anti VEGF terapije također je pokazala bolji rezultat u liječenju tumora pluća i kolona u odnosu na SSKBS (24, 108).

Razvoj i progresija KBS ovisna je o nekoliko međusobno povezanih puteva koji potiču proliferaciju i angiogenezu. Sumrani, prikazani su na slici.16 .

Vezanje VEGF-a, PDGF, EGF na receptore potiče signalne puteve nekoliko serin/treonin protein kinaza. S jedne strane potiče signalni put RAS transdukcijskog proteina koji aktivira protein kinaza kaskadu i obuhvaća fosforilaciju i aktivaciju RAF, MEK i MAPK poznate kao mitogen aktivirajuće protein kinaze. S druge strane vezanje ovih čimbenika na receptore potiče signalni put phosphoinositide 3-kinaze (PI3K) koja preko aktivacije

protein kinaze B(AKT) regrutira mammalian target of rapamycin (mTOR). Protein kinaza kaskada omogućuje djelovanje ovih čimbenika rasta na proliferaciju, preživljenje, diferencijaciju, migraciju te adheziju kako tumorskih tako i endotelних stanica s jedne strane, a s druge strane akumulirajući sustav HIF-a. Neovisno o ovim signalnim putevima sustav HIF-a može biti potaknut hipoksijom ili mutacijom odnosno «utišavanjem» Von Hipel Lindau gena u normoksičnim uvjetima uz pozitivnu povratnu spregu prema spomenutim čimbenicima rasta izazivajući njihovu prekomjernu ekspresiju (109). Kako većina SSKBS demonstrira ovu inaktivaciju funkcije pVHL ovaj signalni put itekako dobiva na važnosti.

### **Slika 17. Signalni putevi uključeni u razvoj i progresiju KBS**

Vežanje VEGF-a, PDGF, EGF na receptore potiče signalne puteve nekoliko serin/treonin protein kinaza. Protein kinaza kaskada omogućuje djelovanje ovih čimbenika rasta na proliferaciju, preživljenje, diferencijaciju, migraciju te adheziju tumorskih i endotelnih stanica te akumulirajući sustav HIF-a. (prilagođeno od Nelson EC, Evans CP, Lara PN., Renal cell carcinoma: Current status and emerging therapies. Cancer Treatment Reviews 2007;33:299-313 (109).

## ***2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA***

1. Utvrditi imunohistokemijski ekspresiju VEGF-A i VEGF-C u svjetlostaničnim tumorima bubrega u usporedbi s okolnim normalnim tkivom bubrega
2. Ispitati angiogenezu putem srednje gustoće krvnih žila u tumoru te usporediti čimbenik regulacije angiogeneze VEGF-A s gustoćom krvnih žila u tumoru
3. Odrediti ekspresiju HIF-1 $\alpha$  imunohistokemijski te ispitati odnos VEGF-A, VEGF-C i HIF-1 $\alpha$  u stanicama bubrežnog karcinoma
4. Odrediti ekspresiju EGFR proteina imunohistokemijskim bojenjem te ispitati metodom fluorescentne in situ hibridizacije moguću amplifikaciju gena za EGFR u tumorskim stanicama te usporediti EGFR s angiogenim čimbenicima
5. Utvrditi ekspresiju p53 tumor supresorskog proteina imunohistokemijski u stanicama karcinoma bubrega i analizirati odnos s VEGF-A i VEGF-C i HIF 1 $\alpha$
6. Usporediti sve čimbenike regulacije angiogeneze s kliničko-patološkim parametrima kao što su nuklearni gradus, Ki67 indeks proliferacije tumorskih stanica, veličina tumora, patološki stadij i petogodišnje preživljenje pacijenata.

### ***3. ISPITANICI I POSTUPCI***

U ovoj studiji korišteni su i ponovo pregledani klinički i patološki nalazi 142 pacijenta koji su kirurški tretirani jednostavnom ili radikalnom nefrektomijom zbog SSKBS-a na Klinici za Urologiju Kliničkog bolničkog centra Rijeka u razdoblju od 1989 do 1994 godine. U istraživanju je korišten arhivski bioptički materijal tumora bubrega te patohistološki podaci očitani iz računalne baze podataka Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci, dok su klinički podaci prikupljeni iz medicinske dokumentacije bolesnika s SSKBS-om Klinici za urologiju. Podatci o dužini preživljenja ispitanika su prikupljeni iz dokumentacije Registra za rak Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo.

#### **3.1. Bioptički materijal**

Arhivski bioptički materijal tumora bubrega dijagnosticiranih u razdoblju od 1989. do 1994. godine standardnim je postupkom fiksiran i uklopljen u parafin (110). U istraživanje su uključeni svi tumori sa potrebnim patohistološkim i kliničkim podacima te dovoljna i reprezentativna količina tumorskog tkiva za analizu. Cjelokupni materijal pojedine biopsije pregledan je i reklasificiran prema klasifikaciji tumora bubrežnih stanica Svjetske zdravstvene organizacije iz 2003 godine (111), te su za potrebe izrade standardnih rezova izdvojena 93 uzorka. Iz iste kohorte od 142 tumorska uzorka SSKBS izabrana su 94 tumora te su iz parafinskih kocaka s najreprezentativnijim dijelom tumorske mase izrađene tkivne mikroareje.

### **3.1.1. Standardni tkivni rezovi**

Temeljem pregleda mikroskopskih preparata odabrala se parafinska kocka s najviše očuvanog tumorskog tkiva, održanih značajki relevantnih za dijagnozu i najzloćudnijih karakteristika. Ovaj materijal je iskorišten za utvrđivanje izražaja VEGF-A na proteinskoj razini, gustoće krvnih žila za procjenu angiogeneze i Ki67 proliferacijskog indeksa, metodom imunohistokemije u usporedbi s nuklearnim gradusom, veličinom tumora, patološkim stadijem i 5-godišnjim preživljenjem u cilju utvrđivanja prognostičkog značaja VEGF-A i angiogeneze.

### **3.1.2 Tkivni rezovi dobiveni metodom tkivnih mikroareja**

Obzirom da su postavljeni ciljevi uključivali brojna istraživanja na temelju imunohistokemijskog obojenja i tehnike fluorescentne in situ hibridizacije (FISH), novija metoda tkivnih mikroareja (TMA, od engl. Tissue microarray) činila se logičnim izborom zbog bolje standardizacije i tumačenja bojenja, štednje bioptičkog materijala te smanjenja troškova istraživanja. Naime, TMA tehnologija je razvijena da se izbjegnu ograničenja konvencionalnih histopatoloških tehnika i da se olakšaju istraživanja koja povezuju molekularnu patologiju sa kliničkim parametrima u okviru izučavanja humanog materijala, posebno tumora. Iako se metode očitavanja još uvijek usklađuju, pogotovo se ubrzano razvijaju automatizirane metode, TMA predstavljaju izvanredno korisno sredstvo ocjenjivanja dijagnostičkih, prognostičkih i terapijskih biomarkera (112). To je mehanička tehnika koja uključuje uzimanje tkivnih cilindara iz parafinskih kocki tzv. donora te precizno umetanje tako dobivenih tumorskih uzoraka u prazan parafinski blok (engl. Recipient). Prije konstrukcije tkivnih mikroareja trebalo je pregledati standardne tkivne rezove tumorskih uzoraka obojenih Hematoxilin–eosinom.. Na staklu se označilo reprezentativno područje tumora bez nekroze i krvarenja, a nakon toga se to područje

označilo i na pripadajućoj parafiskoj kocki. Uglavnom su bile zastupljene po dvije donorske parafinske kocke. Korištenjem ručnog uređaja za izradu tkivnih mikroareja “Alphelys, Plaisir, France” , izrađeni su novi parafinski blokovi koji su sadržavali u prosjeku po tri cilindra tumorskog tkiva od svake biopsije, promjera 1 mm s međusobnim razmacima od 0.5 mm. Cilindri su bili umetnuti u smjeru x i y koordinatnih osi, a normalno jetreno tkivo je korišteno kao orijentacijski mikroarej. Nastojalo se da svaka biopsija bude također zastupljena i s dijelom netumorskog parenhima bubrega. Tako pripremljene parafinske kocke sadržavale su između 40 i 88 mikroareja. Iz njih su kao i iz standardnih parafinskih blokova izrađeni parafinski rezovi debljine 4µm, stavljeni na adhezivna stakla (Capillary Gap Microscope slides, 75 µm, Code S2024, DakoCytomation, Glostrup, Danska) sušeni preko noći na 37° C, skladišteni u mraku na +4° C te potom deparafinizirani i rehidrirani na uobičajen način (110).

### **3.2. Postupci**

#### **3.2.1 Imunohistokemijsko bojanje**

Rezovi parafinskih blokova debljine 4 µm stavljeni su na predmetno stakalce onloženo poly-L-lizinom i ostavljeni da se suše tijekom noći na sobnoj temperaturi. Uzorci su deparafinizirani ksilenom (xylene substitute) tri puta tijekom 10 minuta, te rehidrirani različito postotnim alkoholima. Za rehidraciju je korišten 96% -tni alkohol tijekom 5 minuta, zatim 70%-tni alkohol tijekom sljedećih 5 minuta nakon čega su uzorci tkiva isprani u destiliranoj vodi i ostavljeni da se suše tijekom 10 minuta. Za otkrivanje antigenskih epitopa molekula i za standardne i za TMA rezove primijenjen je toplinom inducirani pretretman (113).

##### **3.2.1.1. Imunohistokemijsko bojanje na standardnim rezovima**

MVD, VEGF-A i Ki67 proliferativni marker su uronjeni u TRIS/EDTA pufer (pH 9.0) i



tretirani toplinom u mikrovalnoj pećnici u četiri ciklusa po 5 minuta . Nakon 20 minuta hlađenja na sobnoj temperaturi rezovi su preinkubirani s otopinom za blokiranje nespecifičnog vezivanja protutijela koja sadrži normalni serum kože (DakoCytomation, Glostrup, Danska) tijekom 30 minuta. Potom su obojeni indirektnom imunoperoksidaza tehnikom uz korištenje Dako REAL ENVISION DETECTION sustav na automatskom imunobojaču DakoCytomation, Autostainer plus, Glostrup, Denmark prema uputama proizvođača. Stakla su inkubirana primarnim protutijelima razrijeđenim u otopini za razrjeđivanje antitijela (DAKO CHEMmate antibody diluent, kataloški broj S 20229) tijekom 25 minuta. Nakon toga su inkubirana sa sekundarnim mišjim ili zečjim protuhumanim protutijelom tijekom 25 minuta. Za inaktivaciju endogene peroksidaze primijenjena je peroksidaza inaktivirajuća otopina (DAKO CHEMmate peroxidase blocking solution kataloški broj S 2023) tijekom 8 minuta te streptavidin-HRP (DAKO CHEMmate detection kit kataloški broj K5001) tijekom 25 minuta. Specifična reakcija vezanja prikazana je diaminobenzidinom (DAB), supstratnim sustavom koji uključuje dvije komponente, otopinu koncentriranog diaminobenzidina i pufersku otopinu sa vodikovim peroksidom uz inkubaciju 15 minuta. Jezgre su kontrastirane hematoksilinom 1 minutu (DAKO CHEMmate hematoxylin kataloški broj S 2020). Između svakog navedenog koraka, osim nakon dodavanja blokirajuće otopine, rezovi su ispirani u puferskoj otopini proizvođača (DAKO CHEMmate buffer kit kataloški broj K5006). Nakon bojanja s hematoksilinom učinjena je rehidracija u 70%-tnom alkoholu (3minute), 96%-tnom alkoholu 3 minute i potom u 100%-tnom alkoholu (3 minute). Potom su rezovi isprani u ksilenu, ostavljeni da se suše 10 minuta, a nakon sušenja uklopili u histomount medij te prekrili pokrovnim stakalcima.

### 3.2.1.2. Procjena imunohistokemijskog bojenja na standardnim rezovima

#### *Određivanje izražaja MVD na standardnim rezovima*

Krvne žile (MVD) vizualizirane su pomoću anti-CD31: klon JC70A, Code No M0823 uz razrijeđenje 1:50 i inkubaciju 30 minuta (DakoCytomation, Glostrup, Danska)). Kvaliteta obojenja je procijenjivana na krvnim žilama pridruženog normalnog bubrega koje su služile kao interna kontrola.

Korištenjem svjetlosnog mikroskopa na srednjem povećanju (x200) su određena tri područja najvećeg broja krvnih žila u svakom tumoru koje smo nazvali «vruće točke» (engl. Hot spots). U svakom od tih područja se na najvećem povećanju (x400) određivao broj krvnih žila, a uzimala se u obzir ona area sa najvećim brojem krvnih žila. Krvne žile s debljom mišićnom stijenkom i žile unutar sklerotičnih područja nisu se uzimale u obzir kod brojenja.

Pojedinačne endotelne stanice ili nakupine endotelnih stanica sa jedva vidljivim lumenom ili bez lumena su smatrane pojedinačnim krvnim žilama i stoga uključene u analizu. U odabranim područjima neovaskularizacije najveća gustoća krvnih žila (MVD engl. microvessel density) je izračunata posebnim testom brojenja uz korištenje Issa 3.1 softvera (Vams, Zagreb, Hrvatska). U konačnici se najveća gustoća krvnih žila prikazala kao broj imunohistokemijski označenih vaskularnih struktura na skeniranom području promjera  $0.076049 \text{ mm}^2$ . Ovakav postupak u skladu je s postupnikom Herbsta i suradnika (114), a temelji se na osnovnoj metodi Weidnera i suradnika (115). Pozitivna kontrola su bile endotelne stanice u normalnim krvnim žilama bubrega.

#### *Određivanje VEGF-A na standardnim rezovima*

Za određivanje VEGF-A na standardnim rezovima korišteno je anti VEGF-A poliklonalno

Antitijelo : C-1:sc.7269 uz razrijeđenje 1:750 i inkubaciju 60 minuta, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz , CA, USA.

Izražaj VEGF-A određivao se semikvantitativno, pa su se prema postotku pozitivnih stanica u tumoru formirale četiri skupine tumora i to: 1. tumori s <25% pozitivnih stanica, 2. tumori s 26-50% , 3. s 51-75% i 4. s 76-100% pozitivnih stanica. VEGF-A citoplazmatsko imunoobojenje se opisivalo kao perimembranozno i difuzno, a VEGF-A histološki raspored u tumorima kao homogen ( pravilna distribucija i intenzitet obojenja unutar tumora ) i heterogen (nepravilno VEGF-A obojenje) (116). Intenzitet obojenja glatkih mišićnih stanica u stijenkama krvnih žila služio je kao pozitivna interna kontrola.

#### *Određivanje Ki 67 na standardnim rezovima*

Proliferativna aktivnost u tumoru je određena pomoću detekcije Ki67, uz korištenje monoklonskog antitijela: klon MIB-1 uz razrijeđenje 1:50 i inkubaciju od 30 minuta, DakoCytomation, Glostrup, Danska). Pozitivna kontrola su bile stanice u mitozu. Ki67 proliferativni marker je utvrđen brojanjem pozitivno obojenih jezgri na 500 tumorskih stanica u području najveće proliferativne aktivnosti odnosno "vruće točke" što se također kvantificiralo pomoću Issa 3.1 softvera ( Vams, Zagreb, Hrvatska).

#### **3.2.1.3. Imunohistokemijsko bojanje na TMA**

VEGF-A i VEGF-C, Ki67, EGFR1 i p53 su uronjeni u Tris/EDTA pufer, pH 9 (sačinjen od 10mM Tris baze i 1 mM EDTA otopine ), a zatim u vodenu kupelj tijekom 15 minuta na temperaturi od 95-100 ° C. Rezovi za HIF1  $\alpha$  uronjeni su u citratni pufer (pH 6.0) te uronjeni u vodenu kupelj na temperaturi od 98° C tijekom 45 minuta. Nakon 20 minuta hlađenja na sobnoj temperaturi rezovi su preinkubirani s otopinom za blokiranje nespecifičnog vezivanja protutijela koja sadrži normalni serum kože (DakoCytomation, Glostrup, Danska) tijekom 30 minuta.

Za određivanje izražaja proteina korištena je envision imunohistokemijska metoda sa REAL ENVISION DETECTION sustavom na automatskom imunobojaču DakoCytomation, Autostainer plus, Glostrup, Denmark prema uputama proizvođača.

Tablica 4. prikazuje karakteristike primarnih protutijela, sustave detekcije, te pozitivne kontrole za pojedine antigene .

**Tablica 4. Primarna protutijela korištena u imunohistokemijskom bojanju na TMA**

<b>Protutijelo</b>	<b>Klon.proizvođač</b>	<b>Razrijeđenje i inkubacija</b>	<b>Sustav detekcije</b>	<b>Pozitivna kontrola</b>
Anti VEGF-A Mišje poliklonalno antitijelo IgG:	C-1:sc.7269 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz , CA, USA	1:750, inkubacija preko noći na temp. od +4°C	REAL ENVISION DETECTION K5007 Dakocytomation	glatkomišićne stanice u krvnim žilama normalnog bubrega
Anti VEGF-C Mišje poliklonalno antitijelo IgG	h-190:sc-9047, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz , CA, USA	1:100, inkubacija preko noći na temp. od +4°C	REAL ENVISION DETECTION K5007 Dakocytomation	Stanice proksimalnih tubula bubrega
Anti HIF1 $\alpha$ Mišje poliklonalno antitijelo IgG	NB 100-131, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	1:3000, inkubacija 30 min	REAL ENVISION DETECTION K5007 Dakocytomation	Glioblastoma
Ki 67 Mišje monoklonalno antitijelo IgG <sub>1</sub>	MIB-1 DakoCytomation, Glostrup, Danska	1:50. inkubacija 30 min	REAL ENVISION DETECTION K5007 Dakocytomation	bojanje mitotskih figura
p53 Mišje monoklonalno antitijelo IgG2b	DO-M7001 DakoCytomation, Glostrup, Danska	1:50, inkubacija 30min	REAL ENVISION DETECTION K5007 Dakocytomation	Tumorske stanice invazivnog karcinoma dojke
EGFR1 Mišje monoklonalno antitijelo IgG1	2-18C9, K1494 DakoCytomation, Glostrup, Danska	READY TO USE Inkubacija 30 min	REAL ENVISION DETECTION K5007 Dakocytomation	Bazalni sloj epidermisa

Rezultate imunohistokemijskog obojenja očitavao je jedan patolog bez znanja kliničko-patoloških podataka o pojedinom tumoru, odnosno pacijentu. Zbog statističke obrade uzimala se u obzir srednja vrijednost određivanih imunohistokemijskih parametara svih triju mikroareja.

#### **3.2.1.4. Procijena imunohistokemijskog bojenja na TMA**

##### *Određivanje imunoizražaja VEGF-A i VEGF-C na TMA*

Imunohistokemijsko obojenje VEGF-A i VEGF-C je određivano kao ukupni postotak pozitivnih stanica, te kao postotak difuznog i/ili postotak perimembranoznog citoplazmatskog obojenja. Također se određivao i intenzitet samog obojenja kao slabo (1), umjereno (2) i snažno (3) pa se umnožak intenziteta i ukupnog postotka prikazivao kao histoscore (HS) .

##### *Određivanje imunoizražaja HIF1 $\alpha$ na TMA*

HIF1 $\alpha$  imunoreaktivnost se određivala na više načina:

1. kao postotak nuklearnog ili citoplazmatskog obojenja na 500 pregledanih stanica u tumorskim područjima ocijenjenim kao područja s najgušćim obojenjem uz mikroskopsko povećanje x400.
2. kao postotak nuklearnog i citoplazmatskog obojenja pozitivnih stanica na 500 pregledanih stanica pomnožen sa intenzitetom obojenja određivanim kao slabo(x1), umjereno (x2) i snažno(x3) što je nazvano histoskor (HS)
3. Kao histoskor (HS) citoplazmatskog obojenja difuznog ili perimembranoznog rasporeda u stanici također izražen na 500 stanica.

Sve se određivalo pomoću Issa 3.1 softvera ( Vams, Zagreb, Hrvatska).

#### *Određivanje imunoizražaja Ki67 i p53 na TMA*

Ki 67 indeks proliferacije i tumor supresorski gen p53 pokazivali su nuklearno obojenje te su se kvantificirali također pomoću spomenutog softverskog alata Issa 3.1 (Vams, Zagreb, Hrvatska). i to kao postotak pozitivnih jezgara na 500 stanica po mikroareju .

#### *Određivanje imunoizražaja EGFR na TMA*

Izražaj receptora za epidermalni faktor rasta određivao se kao postotak stanica koje pokazuju kontinuirano i diskontinuirano membransko obojenje intenziteta od 1-3 (slabo-1; umjereno-2; snažno-3). Postotak pozitivnih stanica pomnožen s intenzitetom prikazan je kao ukupni histoscore (HS), a na taj način smo prikazali i kontinuirano membransko obojenje (HS kontinuirano). Citoplazmatsko obojenje je nađeno u 29 tumora (3.13%) i to vrlo heterogeno, uglavom slabo izraženo (intenzitet 1) u postotku stanica pretežno od 2 % do 10%, u samo jednom tumoru do 80% te se nije uzimalo u obzir u statističkom izračunu.

#### **3.2.2. FISH metoda**

Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) je jedna od najboljih metoda kojima se detektira amplifikacija gena i time rasvjetljava mehanizam prekomjerne izraženosti nekog proteina važnog za progresiju tumora (117). Bazirana je na sposobnosti jednostruke molekule nukleinske kiseline (DNA ili RNA) da se hibridizira. Najvažnije svojstvo ove metode je sposobnost lokalizacije specifičnih DNA sekvenci (slijedova). Metoda je eksperimentalno primjenjena ranih 70-tih prošlog stoljeća da bi zaživjela u kliničkoj praksi u ranim 90-tima. Koristi se u različite kliničke i eksperimentalne svrhe od studija

koje izrađuju mape gena, identificiraju kromosomalne abnormalnosti u genskim poremećajima i tumorima.

Fluorescentna in situ hibridizacija zahtijeva 2 tipa DNA, ciljnu i probnu. Ciljna je proba heterogena DNA molekula imobilizirana na solidnoj podlozi tj stakalcu koja se identificira u razmazu kromosoma u metafazi ili stanica u interfazi dobivenih iz citoloških ili histoloških preparata. Proba je populacija obojene DNA molekule specifične za određeni kromozom, regiju kromosoma ili gena. DNA proba postaje vidljiva pod mikroskopom nakon procedure zvane obojenje nukleinske kiseline. Kod direktnog bojenja modificirane nukleotide sadrže kovalentnim vezama pričvršćeni fluorokrom inkorporiran u probu enzimskom reakcijom sa uključenim fluoresceinom koji daje zeleni signal, rodaminom ili Texas red koji daju crveni signal osvijetljeni svjetlošću specifične valne duljine. Kod indirektnog bojenja nukleotide sadrže takozvane « reporter molekule» inkorporirane u probnu DNA, a otkrivaju se fluorescentnim antitijelima koja se vežu na reporter molekule koje najčešće sadrže biotin i digoxigenin.

FISH se može izvoditi na svježem ili arhivskom materijalu. Nebojeni citološki razmazi ili nebojeni, deparafinirani tkivni preparati mogu biti uspješno obrađeni kroz standardnu FISH metodu.

Standardni protokol podijeljen je u 5 bazičnih stepenica: 1. DNA demaskiranje, 2. denaturacija probne i ciljne DNA, 3. hibridizacija probne i ciljne DNA, 4. Detekcija, 5. analiza fluorescentnim mikroskopom (slika 18).

#### **Slika 18. Shematski prikaz tehnike FISH metode.**

(Prilagođeno prema shemi Wikimedia Commons (2007) Izvor National Genome Research institute, Autor Thomas Ried)

Demaskiranje epitopa varira o fiksaciji, preparaciji tkiva i staničnom tipu te zahtijeva minimalno ili ekstenzivno demaskiranje epitopa kao kod naših preparata koje je

uključivalo i digestiju s proteazom i kuhanje u citratnom ili EDTA puferu. Detekcija varira o tipu bojenja direktnom ili indirektnom metodom.

Postoje različiti tipovi FISH proba, tri najčešća tipa su:

- alfa-satelitne, koje hibridiziraju sa DNA sekvencama u pericentromernoj regiji svakog kromozoma, a koriste se uglavnom za aneusomiju i studije koje uključuju spolne kromosome.

- telomerne probe koje su specifične za sekvencu TTAGGG (n), prisutnu na kraju svih kromosoma, a koriste se za otkrivanje terminalnih delecija na kromosomima.

- mi smo koristili lokus-specifičnu probu koja je specifična za određenu kromozomalnu regiju, grupu gena ili jedan gen i obično se koristi za detekciju amplifikacije gena, deleciju gena ili preustroj kromozoma. Trenutno se najčešće koristi lokus – specifična proba derivirana iz yeats artifičnih kromozoma ( 300-1500kb) ili iz bakterijskih artifičnih kromozoma ( 100-300kb).

Različite su kliničke primjene ove metode ali se one najčešće koriste u svrhe određivanja dijagnoze ili prognoze tumora.

Mi smo ovu metodu iskoristili za dokaz amplifikacije gena EGFR . Obično FISH za detekciju lokusa autozomalnog gena na normalnim stanicama producira samo dva signala koji odgovaraju normalnim alelima. U slučaju genske amplifikacije FISH proizvodi multiple ili često skupine signala (clusters). Usvojena strategija za identifikaciju genske amplifikacije je upotreba proba specifičnih za lokus gena ili kromosomski segment koji uobičajeno amplificira a naziva se amplikon (118,119).

Za našu analizu je odabrano po 18 tumora koji eksprimiraju kontinuirano membransko bojenje intenziteta 1+,2+ i 3+ te su se opisanim načinom za konstrukciju TMA kreirale dvije nove parafinske kocke koje su svaka sadržavale po 27 tumora prezentiranih s jednim cilindrom promjera 1 mm.



TMA parafinske kocke narezane su, rezovi debljine 3µm položeni su u vodenu kupelj na 40°C, plivajući rezovi su nanjeni na pozitivnu stranu organosijaliziranog predmetnog stakalca (DakoREAL™, Glostrup, Danska) i sušeni na sobnoj temperaturi. Tako pripremljeno stakalce se ostavilo preko noći u termostatu na 56°C.

Prvi dan učinjena je deparafinizacija po standardnom postupku 3 puta po 10 minuta u supstituciju Xylena na sobnoj temperaturi, zatim su se stakalca uronila u 100% alkohol po 5 minuta na sobnoj temperaturi te se osušila na termobloku 2-5 minuta na temperaturi od 45-50°C.

### **Pretretman tkiva**

Stakalca su se uronila:

- 20 minuta u 0.2 N HCL na sobnoj temperaturi
- 3 minute u destiliranu vodu na sobnoj temperaturi
- 3 minute u Wash buffer (2XSSC, pH 7.0, Vysis, Abbott Molecular Inc, IL, USA)
- 30 minuta u otopinu za pretretman (1M Na SCN) zagrijanu na 80°C
- 1 minutu u destiliranu vodu na sobnoj temperaturi
- 2x po 5 minuta u Wash buffer (2XSSC, pH 7.0) na sobnoj temperaturi

Zatim je slijedio:

### **Proteazni tretman stakalaca**

- Staničevinom se pažljivo otklonio ostatak pufera sa stakalaca, a onda se urone u proteaznu otopinu zagrijanu na 37°C 45 minuta . Proteazna otopina se priprema tako da se 50 ml proteaznog pufera (NaCl, pH 2.0) , (Abbott Molecular Inc, IL, USA) zagrije na 37°C pa sa neposredno prije same upotrebe doda 25mg proteaze , (Abbott Molecular Inc, IL, USA) i dobro promiješa. Nakon toga su se stakalca uronila 2 x po 5 minuta u Wash buffer (2XSSC, pH 7.0,) na sobnoj temperaturi te osušila u termobloku 2 do 5 minuta na temperaturi od 45-50°C.

Nakon sušenja slijedila je **dehidracija** :

- Stakalca su se uronila u 70% etanol, 85% etanol , te u 100% etanol sve na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 minute u svakom alkoholu. Stakla su se potom osušila na termobloku, 2-5 minuta na temperaturi od 45-50°C.

Zatim se na stakalca nanijela **proba**:

Radi se o LSI EGFR SpectrumOrange /CEP 7 SpectrumGreen Probe 32-191053 (Vysis, Downers Grove, IL, SAD). Proba se čuva u tami na -20°C.

Prije upotrebe proba se zagrije na sobnu temperaturu, a budući da je viskozna treba je polako pipetirati.

### **Hibridizacija**

- Dodalo se 10 µL probe na pokrovnicu veličine 20x20 i preklopilo ju se preko predmetnice
- Stakalca su se potom stavila u hibridizator (HYBrite™, Vysis) preko noći na 37°C ( 14-18 sati)
- Drugi dan prvo se uklonila pokrovnica
- Stakla su se potom 2 minute uronila u posthibridizacijsku otopinu pH 7.0- 7.5 (2x SSC/0.3%NP-40) zagrijanu na 72°C
- Zatim su se stakla posušila na sobnoj temperaturi u mraku
- Nakon sušenja na stakla se nanijelo 10 µL DAPI II (Vysis).

LSI EGFR/CEP7 Dual Color Proba je dizajnirana za utvrđivanje i kvantificiranje broja kopija EGFR gena lociranog na 7p12. LSI EGFR SpectrumOrange pokriva regiju oko 300kb koja sadrži cijeli EGFR gen lociran na 7p12. CEP7 proba u zelenom spektru (Spectrum Green Probe) hibridizira sa alfa satelitom DNA lociranom na centromeri kromosoma 7 (7p11.1-q11.1).

### **Rezultati hibridizacije**

U stanici koja ima normalni broj kopija EGFR gena trebalo bi se očitati 2 narančasta i 2 zelena signala. Abnormalni broj kopija se registrira kada postoji 3 ili više narančastih signala u odnosu na zelene signale. Brojenjem signala na 20 stanica i stavljanjem u međusobni odnos dobili smo omjer koji ukazuje da li postoji amplifikacija gena ili ne. Cut-off omjer između **1.8-2.2** preuzet je iz standardne FISH probe za HER-2 koju koristimo rutinski kod karcinoma dojke (prema uputi proizvođača PathVysion kit-a; Vysis, Downers Grove, IL, SAD). Pojava više od dva centromera 7 signala po stanici definirala se kao polisomija ukoliko je viđena u više od 20% tumorskih stanica (117).

### **3.3. Statistička obrada rezultata**

Rezultati očitavanja su pohranjeni u bazu podataka u «Excel 5.0/7.0(Microsoft)» programu i potom prevedena u statistički software (StatSoft, Inc.,Tulsa, OK, USA) kojim je izvršena statistička analiza. Pearson-ov  $\chi^2$  test je korišten za procjenu značajne povezanosti između kategorijskih parametara. Srednje vrijednosti kontinuiranih parametara kao što su MVD, Ki 67 proliferacijski index, p53, su uspoređivani Mann Whitney  $U$  testom, kao i značajnosti između HIF-1 $\alpha$ , VEGF-A i C te EGFR u usporedbi sa kliničkopatološkim podacima i to nuklearnim gradusom, veličinom tumora i patološkim stadijem. Asocijacija između vrijednosti dobivenih imunohistokemijskim očitavanjima za VEGF-A, VEGF-C, HIF-1 $\alpha$ , EGFR, p53 sa sa preživljenjem pacijenta sa SSKBS je procijenjena upotrebom Kaplan-Maier metode dok su razlike između grupa vrednovane log-rank testom. U multivarijantnoj analizi koristili smo Cox regresijski model. Nivo statističke značajnosti označavao se kao  $p \leq 0.05$  , što bi značilo da razlika između dvije ili više ispitivanih skupina rezultata nije slučajna i da će se ponoviti s barem 95% vjerojatnosti u svakom slijedećem ispitivanju.

## ***4.REZULTATI***

### **4.1. REZULTATI DOBIVENI NA STANDARDNIM TKIVNIM REZOVIMA**

Standardni tkivni rezovi korišteni su za imunohistokemijsku analizu srednje gustoće krvnih žila (MVD), ekspresije VEGF-A u svjetlostaničnim tumorima bubrega i u normalnom tkivu bubrega, za procjenu Ki67 proliferativnog indeksa i utvrđivanje međusobne povezanosti ovih proteina, te povezanosti s kliničkopatološkim karakteristikama i preživljenjem.

#### **4.1.1. Kliničkopatološki podaci bolesnika sa SSKBS**

Kliničko patološke karakteristike 93 pacijenata sa svjetlostaničnim karcinomima bubrežnih stanica u ispitivanom uzorku prikazuje tablica 5.

**Tablica 5. Kliničko patološka obilježja bolesnika sa SSKBS**

<b>OBILJEŽJE</b>	
Dob bolesnika (god)	58(30-82)
Spol bolesnika	
M	62 (67%)
Ž	31 (33%)
Veličina tumora (cm)	6.4 (1.9-15)
Nuklearni gradus (Fuhrman)	
1,2	60
3,4	33
Patološki stadij	
PT 1,2	77 (80%)
PT 3,4	16 (20%)
Petogodišnje preživljenje	62 %

#### **4.1.2.Rezultati dobiveni imunohistokemijskim bojenjem na standardnim rezovima SSKBS**

U normalnom tkivu bubrega VEGF-A ispoljenost je bila homogena i ograničena na citoplazmu tubularnog epitela, glatko mišićne stanice i makrofage u intersticiju te mezangij u glomerulima.(Slika 19 A i B). U SSKBS VEGF se ispoljavao u citoplazmi

tumorskih stanica, endotelnim stanicama i u stromalnim fibroblastima.. VEGF-A obojenje je u tumorima bilo uglavnom heterogeno i to u 67 (72%) tumora, jača imunoreaktivnost se je češće uočavala na periferiji tumora, dok je centar bio slabo ili nikako obojen (Slika 19 C ). Homogeno obojenje sa ujednačenim intenzitetom i distribucijom pozitivnih tumorskih stanica nađeno je u 26(28%) slučajeva SSKBS.

#### **Slika 19. imunohistokemijsko bojenje za VEGF-A**

u normalnom parenhimu bubrega pozitivno je u glatkim mišićnim stanicama u stijenka krvnih žila što je služilo kao pozitivna interna kontrola, makrofagi u tubulointerciciju, mezangijske stanice u glomerulima i citoplazma tubula ( A, povećanje x100; B povećanje x200). U SSKBS-u heterogena VEGF ekspresija jača je na periferiji što pokazuje strelica ( C povećanje x40) )nego u centru tumora (zvjezdica)

U tumorima je opaženo dvojako citoplazmatsko bojenje na VEGF-A, difuzno i perimembranozno. Difuzna citoplazmatska ekspresija nađena je u 61(66%) tumora (slika 20 D), dok je perimembranozna distribucija nađena u 32(34%) SSKBS (slika 20 C). Štoviše, bolje diferencirani tumori s niskim nuklearnim gradusom pokazivali su perimembranozno obojenje dok su tumori s visokim nuklearnim gradusom u pravilu pokazivali difuzno citoplazmatko imunohistokemijsko obojenje VEGF-a. (slika 20 D)

#### **Slika 20. Prikaz HE i imunohistokemijskog obojenja VEGF-A u SSKBS**

Usporedba između niskog (A,C) i visokog nuklearnog gradusa (B,D) svjetlostaničnog karcinoma bubrežnih stanica. HE obojenje(A,B). Perimembranozno (C) i difuzno citoplazmatsko obojenje VEGF(D). Povećanje 200x

Frekvencija distribucije imunohistokemijskog obojenja za VEGF je pokazana na tablici 6.

**Tablica 6. Pojavnost imunohistokemijskog bojenja za VEGF-A\* u SSKBS§**

VEGF-A*		Broj karcinoma(%)
% obojenih stanica	<25%	25 (27 %)
	26-50%	22 (24 %)
	51-75%	18 (19 %)
	76-100%	28 (30 %)
Citoplazmatska ekspresija	perimembranozna	32 (34 %)
	difuzna	61 (66 %)
Raspored ekspresije	heterogeno	67 (72 %)
	homogeno	26 (28 %)

\*vaskularni endotelni čimbenik rasta

§ svijetlostanični karcinom bubrežnih stanica

Izražaj VEGF-A u tumorskim stanicama je uspoređen s imunohistokemijski detektiranim MVD, i Ki67 proliferativnim indeksom da bi se ustanovio utjecaj na angiogenezu i tumorsku proliferaciju.

Krvne žile su također različito raspoređene, i to redovito brojnije na periferiji tumora. Srednja gustoća krvnih žila izražena kao srednja vrijednost broja krvnih žila po standardnoj tumorskoj površini je bila 37,78 ( $\pm 20,11$ ). imunohistokemijsko obojenje na CD31 detektiralo je pojedinačne ili nakupine endotelnih stanica, kao i krvne žile s vidljivim lumenom. Tumori nižeg gradusa su bili izrazito vaskularizirani sa krvnim žilama koje podsjećaju na mrežu peritubularnih kapilara normalnog parenhima. Tumori višeg nuklearnog gradusa su pokazivali oskudniju vaskularizaciju nepravilnijeg izgleda što se vidi na slici 21.

#### **Slika 21. Imunohistokemijsko bojenje na CD 31, prikaz krvnih žila u SSKBS**

Tumori nižeg gradusa su pokazivali obilniju vaskularizaciju nalik na mrežu peritubularnih kapilara normalnog parenhima (A) dok su tumori višeg nuklearnog gradusa slabo vaskularizirani, a krvne žile su nepravilnog izgleda(B).

Srednja vrijednost Ki 67 proliferacijskog indeksa u SKBS-u bila je niska i iznosila je 7,29% ( $\pm 7,03$ ). (Slika 22)

### Slika 22. Oskudno nuklearno obojenje Ki67 u SSKBS

Tek visoka ekspresija VEGF, iznad 75% u tumorima, bila je povezana sa nižim MVD ( $p=0,034$ ) i višim proliferativnim indeksom ( $p=0,023$ ) (tablica 8). Osim na postotku, statistička povezanost bazirana na citoplazmatskoj distribuciji VEGF-A ekspresije u odnosu na spomenute parametre pokazala se statistički značajnom u odnosu difuznog obojenja VEGF-A i tumora veće proliferativne aktivnosti ( $p=0,004$ ) dok se nije našla s MVD ( $p=0,152$ )

**Tablica 7. Ekspresija VEGF-A\* u usporedbi s MVD<sup>†</sup> i Ki67 proliferativnim indeksom u SSKBS<sup>§</sup>**

VEGF-A* (n)		MVD (srednja vrijednost $\pm$ SD)	<i>p</i>	Ki67 index (%) (srednja vrijednost $\pm$ SD)	<i>p</i>
ekspresija	niska $\leq 75\%$ (63)	40,8 $\pm$ 2,561	0,034	5,5 $\pm$ 0,801	0,023
	visoka $\geq 75\%$ (30)	31,2 $\pm$ 3,391		10,5 $\pm$ 1,708	
Citoplazmatska ekspresija	perimembranozna (32)	42,3 $\pm$ 3,772	0,152	3,9 $\pm$ 0,8	0,004
	difuzna (61)	35,8 $\pm$ 2,511		8,709 $\pm$ 1,037	

\*vaskularni endotelni čimbenik rasta

§ svijetlostanični karcinom bubrežnih stanica

MVD<sup>†</sup> Srednja gustoća krvnih žila

Kod tehnike dvostrukog obojenja primijetili smo da u području tumora s intenzivnom ekspresijom VEGF-a nije bilo nuklearnog pozitiviteta na Ki67i obratno, kada se Ki 67 ispoljio u jezgrama nije bilo pozitiviteta na VEGf što pokazuje slika 23.



**Slika 23. Imunohistokemijska ekspresija VEGF i Ki67 prikazana dvostrukim obojenjem.** Crveno difuzno citoplazmatsko VEGF obojenje te Ki67 negativna nuklearna reakcija (A). Fokus mnogih pozitivnih Ki67 tumorskih stanica (smeđe obojenje) i VEGF negativne tumorske stanice (B)

#### **4.1.3 . Povezanost imunohistokemijskog izražaja VEGF -A s kliničkopatološkim parametrima bolesnika sa SSKBS**

Nadalje VEGF-A je uspoređen s obilježjima tumora kao što su veličina, nuklearni gradus, patološki stadij te sa 5-godišnjim preživljenjem bolesnika u cilju određivanja prognostičkog značenja ekspresije ovog angiogenog čimbenika. Podijelili smo tumore, obzirom na patološki stadij, u dvije grupe: one ograničene na bubreg (pT1 ili pT2) i na one koji se šire izvan njega (pT3 ili pT4 ). Obzirom na Fuhrman nuklearni gradus tumore smo također rasporedili kao NG 1 i 2 u jednu skupinu a NG 3 i 4 u drugu.

Statistička analiza je koristeći sustav ekspresije VEGF-A u četiri stupnja nije pokazala pokazala značajnu povezanost sa spomenutim kliničko patološkim parametrima: sa NG12  $p=0,060$ , ( $\chi^2$ ), sa TS12  $p=0,303$ , ( $\chi^2$ ), sa pT12  $p=0,763$ , ( $\chi^2$ ), s preživljenjem  $p=0,552$ , ( $\chi^2$ ).

Statistička značajnost pokazala se samo za tumore izrazito visoke ekspresije VEGF-A. Ova skupina tumora s ispoljenošću VEGF iznad 75 % u tumoru povezana je sa višim nuklearnim gradusom ( $p=0,018$ ) i većim promjerom svjetlostaničnog karcinoma ( $p=0,009$ ), dok patološki stadij nije pokazivao statistički značajnu povezanost ( $p=0,233$ ). Petogodišnje preživljenje u grupi tumora s ekspresijom VEGF-A manjom od 75% je bilo 71,67% dok je u grupi tumora s ekspresijom VEGF-A većom od 75% preživljenje 64,29% bez statistički značajne razlike između grupa. ( $p=0,651$ ). Osim na postotku, statistička povezanost bazirana na citoplazmatskoj distribuciji VEGF-A ekspresije u odnosu na spomenute parametre pokazala se statistički značajnom u odnosu difuznog obojenja

VEGF-A i tumora višeg nuklearnog gradusa ( $p=0,005$ ). Skoro signifikantna razlika između difuzne i perimembranozne distribucije našla se za tumorski stadij ( $p=0,056$ ) ali ne i za veličinu tumora ( $p=0,371$ ). Rezultat dobiven pri usporedbi preživljenja između tumora s perimembranoznom ekspresijom VEGF koje je bilo 70,97% u odnosu na one s difuznom distribucijom koje je iznosilo 67,86% također nije bio značajan ( $p=0,687$ ). Svi navedeni rezultati su vidljivi na tablici 9 i 10.

**Tablica 8. Povezanost između VEGF\* ekspresije i Fuhrman nuklearnog gradusa i veličine tumora u SSKBS§**

VEGF* (n)		VT† (cm) (± SD)	<i>p</i> -	NG&		<i>P</i>
				1	2	
Ekspresija	Niska ≤75% (63)	6,367 ± 0,355	0,009	46	17	0,018
	visoka ≥75% (30)	8,172 ± 0,625		14	16	
Citoplazmatska distribucija	perimembranozna (32)	6,684 ± 0,586	0,371	27	5	0,005
	difuzna (61)	7,059 ± 0,387		33	28	

\*vaskularni endotelni čimbenik rasta

§ svijetlostanični karcinom bubrežnih stanica

† veličina tumora

&nuklearni gradus

**Tablica 9. Ekspresija i citoplazmatska distribucija VEGF\* u odnosu na patološki stadij bolesti i petogodišnje preživljenje u pacijenata sa SSKBS§**

VEGF* (n)		<i>p</i> -	pT‡ (n)		<i>P</i>	Preživlje- nje (%)	<i>P</i>
			1	2			
Ekspresija	niska ≤ 75 % (63)	0,009	54	9	0,233	71,67	0,651
	visoka ≥ 75 % (30)		23	7		64,29	
Citoplazmatska distribucija	perimembranozna (32)	0,371	30	2	0,056	70,97	0,687
	difuzna (61)		47	14		67,86	

\*vaskularni endotelni čimbenik rasta

§ svijetlostanični karcinom bubrežnih stanica

† veličina tumora

‡ patološki stadij

## **4.2. Rezultati dobiveni na tkivnim mikroarejima SSKBS**

Nakon što je na standardnim rezovima ustanovljena povezanost VEGF-a sa angiogenezom u SSKBS te različita pojavnost u citoplazmi, na tkivnim mikroarejima smo pokušali rekonstruirati neke od njegovih regulatornih mehanizama kroz HIF1 $\alpha$ , tumor supresor gen p53, EGFR i usporediti ga sa drugim važnim čimbenikom angiogeneze iz iste familije VEGF-C, te ustanoviti povezanost svih ispitivanih proteina sa kliničkopatološkim parametrima proliferacijom stanica i preživljenjem pacijenata.

### **4.2.1. Kliničko patološki podatci bolesnika sa SSKBS**

Izabrana su 94 tumorska uzorka SKBS tumora te su iz parafinskih kocaka s najreprezentativnijim dijelom tumorske mase izrađene tkivne mikroareje. Kliničko patološke podatke za tumore analizirane tehnikom tkivnih mikroareja prikazuje tablica 10. Za potrebe statistike grupirali smo nuklearni gradus u dvije skupine, u jednoj su NG 1 i 2 a u drugoj su NG 3 i 4, dok je za patološki stadij u statističkim analizama bila važnija podjela na tumore do 7 cm (pT 1) i na tumore veće od 7 cm te one koji se šire izvan bubrega (pT 2,3,4).

Praćenje pacijenata sa tumorima analiziranim tehnikom TMA je bilo dostupno za 87 pacijenata, a vrijeme preživljavanja bilo je računato od datuma operacije do datuma smrti ili datuma zadnje kontrole s medijanom od 64 mjeseci.

Srednja vrijednost proliferativne aktivnosti u tumorima izražena kao postotak Ki 67 pozitivnih jezgara na 1500 stanica ili 500 stanica po mikroareji bila je  $10,7 \pm 5.9\%$ , a služila je kao «cut off» vrijednost ispod koje je proliferativna aktivnost bila niska (Ki 67-1) a iznad koje je bila visoka (Ki 67-2).

**Tablica 10. kliničko patološki podatci za tumore analizirane tehnikom TMA**

Obilježje	
Dob bolesnika (god.), medijan (raspon)	61 (27-82)
Spol bolesnika	
M	59 (62.8%)
Ž	35 (37.2%)
Veličina tumora (cm), medijan (raspon)	6,3 (1,8-17,5)
Fuhrmanov nuklearni gradus, br. (%)	
1	12 (12,8 %)
2	40 (42,6 %)
3	22 (23,4 %)
4	20 (21,2 %)
Patološki stadij, br. (%)	
1 i 2	71 (75,5 %)
3 i 4	23 (24,5 %)
Ki 67 proliferativni indeks (%), srednja vrijednost±standardna devijacija	10,7±5,9
Petogodišnje preživljenje (87pacijenata) (mj.), medijan (raspon)	64 (1-165)

#### **4.2.2. Rezultati imunoistokemijskog bojenja VEGF-A, VEGF-C, HIF-1 $\alpha$ i p53 na**

##### **TMA SSKBS i kliničkopatološki prametri**

Izražaj VEGF-A u normalnom i tumorskom tkivu odgovarao je onome u standardnim rezovima kako je već opisano. VEGF-A imunobojenje se očitavalo kroz postotak pozitivnih stanica, histoscore (HS) koji obuhvaća postotak i intenzitet obojenja pozitivnih stanica, te kroz distribuciju obojenja u citoplazmu pa se registrirao postotak perimembranoznog i postotak difuznog obojenja tumorskih stanica

Medijan HS za ukupni VEGF-A je iznosio 47,5 s rasponom od 0 do 222,5, a za postotak pozitivnih tumorskih stanica je iznosio 38,3% s rasponom od 0 do 100. VEGF je i na TMA ispoljavao imunoreaktivnost u tumorima heterogeno kao citoplazmatsku ekspresiju različitog intenziteta i postotka u tumorima, te se također uzimala u obzir pri statističkom izračunu kao perimembranozna i/ili difuzna. Raspodjela prema postotku perimembranoznog ili difuznog obojenja u citoplazmi pokazala se statistički puno važnija od ukupnog postotka pozitivnih stanica ili intenziteta udruženog s postotkom (HS).

Vrijednost medijana za postotak perimembranoznog obojenja za VEGF-A (pVEGF-A) bio je 12,7 s rasponom od 0-94, a medijan za postotak difuznog citoplazmatskog obojenja za VEGF-A (dVEGF-A) je bio 10 (0-92).

Imunohistokemijski izražaj VEGF-C u normalnom parenhimu bubrega poput VEGF-A uočavao se u citosolu epitela kortikalnih tubula, mezangiju glomerula, endotelnim stanicama, te intersticijskim makrofagima. U SSKBS se uočavala heterogena ekspresija različitog intenziteta i postotka pozitivnih tumorskih stanica te je također kao i kod VEGF-A uočena perimembranozna i/ili difuzna distribucija ovog angiogenog čimbenika u citoplazmi (Slika 24). Medijan HS za ukupni VEGF-C iznosio je 100 s rasponom od 3 do 233,3, a za % pozitivnih tumorskih stanica je iznosio 95 s rasponom od 3 do 100. Vrijednost medijana za postotak perimembranoznog obojenja za VEGF-C (pVEGF-C) je iznosio 46,3 s rasponom od 0-100. Medijan za postotak difuznog citoplazmatskog obojenja za VEGF-C (dVEGF-C) imao je vrijednost od 26,3 s rasponom od 0-100.

#### **Slika 24. VEGF-C imunohistokemijska ekspresija**

u normalnom tkivu bubrega (a), te u SSKBS (b) perimembranozna distribucija i (c) difuzna distribucija u citoplazmi

HIF1 $\alpha$  se u normalnom bubrežnom parenhimu nalazio u tubularnim stanicama kao difuzno citoplazmatsko obojenje te slabo u mezangiju nekih glomerula bez precizne

povezanosti sa strukturama glomerula pa smo takvo obojenje proglasili nespecifičnim a glomerule negativnim za ekspresiju HIF1  $\alpha$ . U SSKBS imunobojenje je bilo prisutno u tumorskim stanicama i u jezgrama i /ili citoplazmama i to od blago do snažno izraženog intenziteta bojenja (Slika 25). Citoplazmatski pozitivitet je pokazivao i perimembranozni i difuzni crtež, ali je samo difuzno bojenje u citoplazmi bilo značajno za statističku obradu te je korišteno u daljnjoj statističkoj obradi. Tumori su pokazivali različite proporcije nuklearnog (nHIF1 $\alpha$ ) i citoplazmatkog obojenja (cHIF1 $\alpha$ ). Median za postotak nuklearnog obojenja je bio 47,1 s rasponom od 16,3-82,3, te za postotak citoplazmatske imunoreaktivnosti 12,9 sa rasponom od 1,4-75).

#### **Slika 25. Imunohistokemijsko obojenje HIF-1 $\alpha$**

u normalnom renalnom parenhimu opaža se homogeno citoplazmatsko obojenje u stanicama tubula te vrlo slabo obojenje u glomerulima koje smo protumačili kao negativno(a), u SSKBS HIF-1 $\alpha$  imunoreaktivnost se prezentirala kao nuklearna i/ili citoplazmatska

Vrijednost ekspresije p53 proteina izražena je kao postotak imunohistokemijski pozitivnih jezgara od ukupno 500 stanica po svakom uzorku tumora te je median za postotak nuklearnog obojenja iznosio 40,5 (12-90,9), a srednja vrijednost  $41,3 \pm 15,8$ . Slika 26. prikazuje visoku reaktivnost p53 u SSKBS.

#### **Slika 26. Visoka nuklearna ekspresija p53 u SSKBS**

#### **4.2.3. Korelacija rezultata imunohistokemijskog bojenja u SSKBS**

Pearson-ova korelacija pokazala je statistički značajnu vezu jedino između difuznog citoplazmatskog obojenja VEGF-A i VEGF-C ( $p=0,001$ ,  $r_p=0,586$ ), dok perimembranozna distribucija ova dva angiogena čimbenika nije bila statistički povezana

( $p=0,403$ ,  $r=0,090$ ). Difuzni VEGF-A je pokazivao inverznu korelaciju sa nuklearnim HIF-1 $\alpha$  ( $p=0,002$ ) koji je i prema dVEGF-C pokazivao gotovo statistički značajnu inverznu povezanost ( $p=0,053$ ). S perimembranoznim citoplazmatskim obojenjem VEGF-A, n HIF-1 $\alpha$  nije imao značajnu povezanost, kao ni sa pVEGF-C (tablica 11). P53 nije bio značajno povezan sa postotkom VEGF-A imunopozitivnih stanica u SSKBS (Pearson korelacija  $p=0,776$ ;  $r=0,03$ ), niti sa HS (Pearson korelacija  $p=0,748$ ;  $r=0,035$ ). Uspoređujući citoplazmatsku distribuciju VEGF-A sa p53 imunopozitivnim stanicama vidjelo se da niti pVEGF-A distribucija (Pearson korelacija  $p=0,880$ ;  $r=0,016$ ), niti dVEGF-A citoplazmatsko obojenje (Pearson korelacija  $p=0,604$ ;  $r=0,057$ ) ne daju statističku povezanost (tablica 11). Veći postotak VEGF-C (%) pozitivnih stanica u SSKBS bio je značajno povezan sa većim postotkom p53 pozitivnih jezgara u tumorima (Mann-Whitney:  $p=0,037$ ). Isto tako je viši histoscore nuklearnog HIF-1 bio statistički značajno povezan sa višim postotkom p53 (Mann-Whitney:  $p=0,025$ ) dok je viši HS citoplazmatskog difuznog HIF-1 $\alpha$  bio značajno povezan s manjim postotkom p53 pozitivnih stanica. (Mann-Whitney:  $p=0,038$ ).

**Tablica 11. Povezanost VEGF-A sa VEGF-C, HIF-1 $\alpha$  i p 53**

* VEGF-A %	HIF-1 $\alpha$ (%)				* VEGF-C (%)				p53 (%)	
	$f_{nHIF-1\alpha}$ $p^1$	$r_{p^1}$	$\dagger_{cHIF-1\alpha}$ $p^1$	$r_{p^1}$	$\S_{pVEGF-C}$ $p^1$	$r_{p^1}$	$\xi_{dVEGF-C}$ $p^1$	$r_{p^1}$	$p^1$	$r_{p^1}$
$\S_{pVEGF-A}$	0,535	0,068	0,002	-0,322	0,403	0,090			0,880	0,016
$\xi_{dVEGF-A}$	0,094	-0,180	<0,001	0,526			0,001	0,586	0,604	0,057

<sup>1</sup>Pearson-ova korelacija

$\S_{pVEGF-A/C}$  perimembranozna distribucija u citoplazmi

$\xi_{dVEGF-A/C}$  difuzna distribucija u citoplazmi

$f_{nHIF-1\alpha}$  nuklearna ekspresija

$\dagger_{cHIF-1\alpha}$  citoplazmatska ekspresija

#### 4.2.4. Rezultati imunohistokemijske i FISH analize EGFR

Izražaj receptora za epidermalni faktor rasta smo određivali kao postotak stanica koje pokazuju kontinuirano i diskontinuirano membransko obojenje intenziteta od 1-3 ( slabo-1; umjereno-2; snažno-3) te je srednja vrijednost ukupnog postotka pozitivnih stanica iznosila 38,40% ( $\pm 33,92$ ). Postotak pozitivnih stanica pomnožen s intenzitetom prikazan kao ukupni histoscore (HS) iznosio je 56,54% ( $\pm 62,23$ ). Na taj način smo prikazali i kontinuirano membransko obojenje (HS kontinuirano) koje je iznosilo 48,18% ( $\pm 63,88$ ) .

#### Slika 27. Imunohistokemijsko membransko obojenje za EGFR

(a) diskontinuirano i kontinuirano membransko obojenje slabog i srednjeg intenziteta (+/++). (b) kontinuirano imunoobojenje jakog intenziteta (+++)

Učinjena su dva uzastopna FISH bojenja u kojima se očitao 15 mikroareja tumora koji su ekspimirali snažno kontinuirano imunohistokemijsko obojenje (3+), 16 mikroareja tumora koji su ekspimirali umjereno obojenje (2+), te 12 mikroareja tumora koji su ekspimirali slabo kontinuirano membransko obojenje (1+) (slika 28).

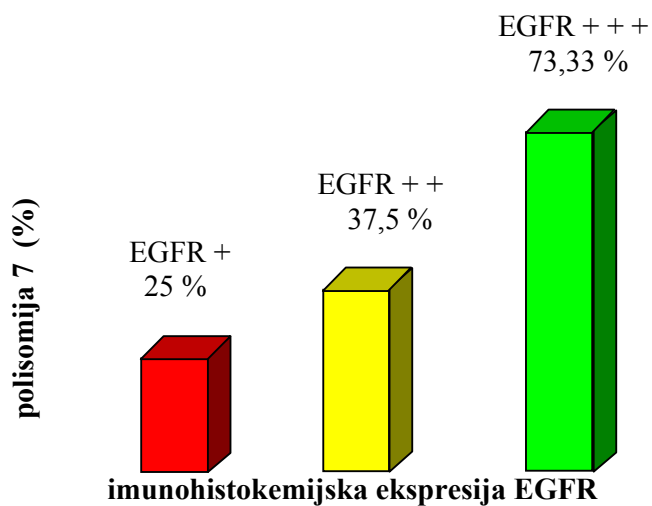
#### Slika 28. EGFR prikazan metodom fluorescentne in situ hibridizacije

Hibridizacija je učinjena pomoću proba za centromere7 (crveno) i EGFR ( zeleno ) (a) U jezgrama tumorskih stanica se mogu izbrojiti i do 4 crvena (centromera7) i 4 zelena (EGFR) signala što govori u prilog polisomiji.(b) U jezgrama normalnih stanica nalaze se 2 crvena centromera 7 i 2 zelena EGFR signala

U 11 ( 73,33%) TMA tumora sa snažnom EGFR membranskom ekspresijom ili u 25,58% svih tumora ispitivanih FISH metodom uočili smo više od 20% stanica sa većim brojem centromera 7 signala po stanici što smo definirali kao polisomiju. U grupi umjerene ekspresije EGFR, 6 od 16 (37,5%) tumora ili u 13,9% svih tumora pokazivalo je polisomiju, dok su samo 3 tumora sa slabom EGFR ekspresijom od 12 (25%) ispitanih



ispoljavali polisomiju, odnosno u 6,9% svih FISH-om pregledanih SSKBS što se vidi na slici 29.



**Slika 29. Zastupljenost (%) polisomije s obzirom na intenzitet membranske ekspresije EGFR-a na tumorskim stanicama SSKBS**

Uspoređujući ekspresiju EGFR na proteinskom nivou tumora promatranih imunobojeanjem i FISH metodom dobili smo statistički značajnu korelaciju i za ukupni postotak imuno pozitivnih stanica ( $p \leq 0,001, r = 0,297$ ) i za HS ( $p \leq 0,001, r = 0,231$ ) te za HS kod kontinuiranog membranskog obojenja ( $p \leq 0,001, r = 0,255$ ) što bi značilo da sadržaj na genskom nivou prati proteinsku ekspresiju. Rezultati su prikazani u tablici 12.

**Tablica 12. Povezanost FISH za EGFR i imunoekspresije EGFR**

	Srednja vrijednost	Std.Dv.	r(X,Y)	r <sup>2</sup>	p
<b>FISH EGFR %</b>	16,653	15,358			
<b>EGFR %</b>	55,747	31,779	0,545	0,297	0,0003
<b>FISH EGFR %</b>	16,653	15,358			
<b>EGFR HS</b>	84,486	65,610	0,481	0,231	0,0019
<b>FISH EGFR %</b>	16,653	15,358			
<b>EGFR kontinuo</b>	74,680	70,358	0,505	0,255	0,0010

#### 4.2.5. Korelacija rezultata EGFR s ostalim imunohistokemijski analiziranim paramaterima

Sve dobivene vrijednosti smo usporedili s vrijednostima ukupnog postotka VEGF-A pozitivnih stanica, HS te postotka stanica s perimembranoznim, odnosno difuznim imunoobojenjem citoplazme što je sve prikazano u tablici 12 (Pearsonova korelacija). Vidjelo se da su sve EGFR varijable obrnuto proporcionalno povezane s postotkom stanica perimembranoznog imunoizražaja VEGF-A dok su proporcionalno povezane s postotkom stanica difuznog obojenja citoplazme .

**Tablica 13 . Korelacije EGFR i VEGF- A**

EGFR	*VEGF A							
	%		HS		§pVEGF-A		£dVEGF-A	
	r	p	r	p	r	p	r	p
%	0,083	0,435	0,011	0,918	-0,189	0,075	0,281	0,007
HS	0,102	0,339	0,009	0,932	-0,211	0,046	0,326	0,001
HS	0,077	0,468	-0,015	0,886	-0,234	0,026	0,315	0,002
kontinuirano								

\*vaskularni endotelni čimbenik rasta

§perimembranozna citoplazmatska ekspresija

£ difuzna citoplazmatska ekspresija

Na isti način smo usporedili i VEGF-C što je prikazano u tablici.13 i dobili sličan rezultat. Sve varijable EGFR su bile proporcionalno povezane s postotkom stanica

difuznog imunoizražaja VEGF-C dok su obrnuto proporcionalno povezane s postotkom stanica perimembranoznog obojenja citoplazme.

**Tablica 14 . Korelacije EGFR i VEGF-C**

EGFR	*VEGF C							
	% kontinuirano		HS		§pVEGF-C		£dVEGF-C	
	r	p <sup>1</sup>	r	p <sup>1</sup>	r	p <sup>1</sup>	r	p <sup>1</sup>
%	-0,199	0,064	-0,097	0,371	-0,451	<0,001	0,317	0,002
HS	-0,196	0,069	-0,196	0,311	-0,434	<0,001	0,294	0,005
HS	-0,182	0,090	-0,091	0,397	-0,423	<0,001	0,289	0,006

\*vaskularni endotelni čimbenik rasta  
§perimembranozna citoplazmatska ekspresija  
£ difuzna citoplazmatska ekspresija

HIF-1 $\alpha$  nije pokazao korelaciju s EGFR vrijednostima (rezultati nisu prikazani).

Izražaj p53 je Pearsonovom korelacijom bio približno statistički značajno obrnuto proporcionalno povezan jedino s ukupnim postotkom EGFR pozitivnih stanica u uzorcima SSKBS ( p=0,62; r=0,203), dok ostale vrijednosti EGFR nisu pokazivale povezanost (rezultati nisu prikazani).

FISH metoda nije pokazala povezanost EGFR sa VEGF-A ekspresijom u SSKBS ali je difuzna citoplazmatska ekspresija VEGF-C pokazivala značajnu proporcionalnu povezanost s polisomijom EGFR gena. Naime, niži postotak difuzne imunoekspresije VEGF-C povezan je sa nižim izražajem EGFR na genskom nivou i obrnuto ( Mann-Whitney U test: p=0,045).

Također se nije našla značajna povezanost p53 s EGFR ispitanim FISH metodom kroz postotak izražene polisomije (p=0,351, r=-0,153, Pearson korelacija).

#### **4.2.6. Povezanost svih analiziranih parametara na TMA s kliničkopatološkim podacima bolesnika sa SSKBS**

##### **4.2.6.1. VEGF-A i kliničkopatološki parametri**

Ekspresija VEGF-A u tumorskim stanicama uspoređena je sa prognostičkim parametrima: nuklearnim gradusom, veličinom tumora, patološkim stadijem i Ki 67 proliferativnim indeksom u skupini TMA.

Statističku značajnost u korelaciji s nuklearnim gradusom smo dobili kroz analizu postotka pozitivnih stanica u tumoru ( $p=0,015$ ) i HS ( $p=0,033$ ) te je viši nuklearni gradus (3,4) bio povezan s većim postotkom intenzivnije pozitivnih stanica. Viši nuklearni gradus bio je izrazito povezan i s većim postotkom pozitivnih stanica difuznog citoplazmatskog obojenja ( $p<0,001$ ). Perimembranozni način ekspresije u citoplazmi nije bio povezan s nuklearnim gradusom (tablica 15).

U analizi korelacije veličine tumora i VEGF-A statistički značajna povezanost dobila se jedino kroz analizu difuznog citoplazmatskog obojenja te su veći tumori bili povezani s većim postotkom d VEGF-A (tablica 15). Statističku povezanost između tumora manjih od 7 cm (pT1), odnosno većih od 7 cm i proširene bolesti (pT2,3,4) i VEGF-A dobili smo uspoređujući HS ( $p=0,034$ ) i d VEGF-A ( $p=0,027$ ). Difuzno citoplazmatsko obojenje se opet pokazalo važnim opažanjem u prognostičkom smislu (tablica 16).

Ki67 indeks proliferacije tumorskih stanica nije pokazivao nikakvu statistički značajnu povezanost niti s jednim načinom analize VEGF-A ispoljenosti. Kako smo na standardnim rezovima dobili značajnu povezanost s visokim postotkom VEGF-A ukupno i d VEGF-A postavlja se pitanje da li su tkivne mikroareje dobra metoda za analizu ovog čimbenika (tablica 16).

**Tablica15. Ekspresija VEGF<sup>\*</sup>-A u odnosu na kliničkopatološke parametre na TMA**

VEGF <sup>*</sup> -A (n)		NG <sup>&amp;</sup>		p	VT <sup>†</sup>		p
		1,2	3,4		≥ 7	≤7	
Ekspresija VEGF <sup>*</sup> -A	%	26,2 (0-100)	55 (1,18-100)	0,015	31,8 (0-97,5)	46,7 (0,7-100)	0,241
	HS	31,8 (0-203,3)	68,3 (1,18-222,5)	0,033	38,8 (0-203,3)	56,7 (0,7-222,5)	0,170
Citoplazmatska ekspresija	perim.	15 (0-94)	12,5 (0-75)	0,307	15 (0-94)	7,5 (0-75)	0,173
	dif.	6,7 (0-92,5)	30 (0-90)	≤0,001	6,7 (0-67,5)	16,7 (0-92,5)	0,015

\*vaskularni endotelni čimbenik rasta

† veličina tumora

&amp; nuklearni gradus

**Tablica16. Ekspresija VEGF<sup>\*</sup>-A u odnosu na kliničkopatološke parametre na TMA**

VEGF <sup>*</sup> -A (n)		pT <sup>‡</sup>		p	Ki67(%)		p
		1	2,3,4		1	2	
Ekspresija VEGF <sup>*</sup> -A	%	28,1 (0-96,7)	51,3 (1,7-100)	0,065	37,3 (0-100)	33 (0-100)	0,680
	HS	35,5 (0-203,3)	56,7 (1,7-222,5)	0,034	51,5 (0-222,5)	40 (0-205)	0,668
Citoplazmatska ekspresija	perim	12,1 (0-94)	17,5 (0-75)	0,682	12,5 (0-94)	12,7 (0-75)	0,658
	dif	6,3 (0-76,7)	11,7 (0-92,5)	0,027	10,6 (0-92,5)	10 (0-83,3)	0,652

\*vaskularni endotelni čimbenik rasta

‡ patološki stadij

**4.2.6.2 VEGF-C i kliničkopatološki parametri**

Statističku značajnost u korelaciji s nuklearnim gradusom smo dobili samo kroz analizu distribucije citoplazmatskog obojenja u tumorskim stanicama pa je viši nuklearni gradus (3,4) bio je povezan s većim postotkom pozitivnih stanica s difuznim citoplazmatskim obojenjem (p=0,004). Niži nuklearni gradus bio je izrazito povezan i s većim postotkom pozitivnih stanica perimembranoznog citoplazmatskog obojenja (p<0,001). U analizi korelacije veličine tumora i VEGF-C statistički značajna povezanost dobila se također samo kroz analizu perimembranoznog i difuznog citoplazmatskog obojenja te su manji

tumori značajno povezani sa perimembranoznim obojenjem pVEGF-C ( $p=0,007$ ), a veći s većim postotkom d VEGF-C (0,007) (tablica 17).

Statističku povezanost između pT1, svih ostalih stadija i VEGF-C dobili smo samo u usporedbi perimembranoznog citoplazmatskog rasporeda VEGF-C ( $p=0,042$ ), pa su tumori manji od 7 cm imali veći postotak pVEGF-C pozitivnih stanica (tablica 18).

Kao i u prethodnoj analizi s VEGF-A, Ki67 indeks proliferacije tumorskih stanica nije pokazivao nikakvu statistički značajnu povezanost niti s jednim načinom analize VEGF-C ispoljenosti (tablica 18).

**Tablica 17. Ekspresija VEGF\*-C u odnosu na kliničkopatološke parametre na TMA**

VEGF*-C (n)		NG <sup>&amp;</sup>		p	VT <sup>†</sup>		p
		1,2	3,4		≥ 7	≤ 7	
Ekspresija VEGF*-C	%	95 (12,5-100)	93,3 (3-100)	0,248	95 (10-100)	94,5 (3-100)	0,917
	HS	100 (12,5-220)	102,5 (3-233,3)	0,607	100 (10-220)	100,8 (3-233,3)	0,615
Citoplazmatska distribucija	perim	65 (0-100)	14 (0-92,5)	≤0,001	64,2 (0-100)	27,9 (0-100)	0,007
	dif	18,5 (0-100)	37 (0-100)	0,004	18 (0-100)	37,1 (0-100)	0,007

\*vaskularni endotelni čimbenik rasta

† veličina tumora

& nuklearni gradus

**Tablica 18. Ekspresija VEGF\*-C u odnosu na kliničkopatološke parametre na TMA**

VEGF*-C (n)		pT <sup>‡</sup>		p	Ki67(%)		p
		1	2,3,4		1	2	
Ekspresija VEGF*-C	%	93.3 (12.5-100)	96.7 (3-100)	0.847	95 (10-100)	93.3 (3-100)	0.299
	HS	100 (12.5-220)	101.7 (3-233.3)	0.657	100 (10-233.3)	100 (3-210)	0.754
Citoplazmatska distribucija	perim	61.3 (0-100)	33.3 (0-100)	0.042	45 (0-100)	55 (0-100)	0.913
	dif	20 (0-100)	30 (0-100)	0.109	25 (0-100)	26.3 (0-100)	0.516

\*vaskularni endotelni čimbenik rasta

‡ patološki stadij

#### 4.2.6.1. HIF-1 $\alpha$ i kliničkopatološki parametri

Nuklearni HIF-1 $\alpha$  je bio povezan s nižim nuklearnim gradusom ( $p=0,006$ ) i manjim tumorima ( $p=0,057$ ) ukazujući na bolju prognozu, dok je citoplazmatska ekspresija bila značajno povezana sa lošijim prognostičkim faktorima tj sa višim nuklearnim gradusom ( $p=0,006$ ), većim tumorima ( $p=0,009$ ) (tablica 19) i višim stadijem maligne bolesti ( $p=0,023$ ) (tablica 20). Ki67 indeks proliferacije statistički je bio značajno povezan jedino kada smo podijelili nuklearni izražaj HIF-1 $\alpha$  temeljem medijana na visoku i nisku ekspresiju te je Mann-Whitney U-test pokazao povezanost veće proliferacije s većim postotkom nHIF-1 $\alpha$  ( $p=0,022$ ).

**Tablica 19. Ekspresija HIF<sup>\*</sup>-1 $\alpha$  u odnosu na kliničkopatološke parametre na TMA**

HIF <sup>*</sup> -1 $\alpha$ %	NG <sup>&amp;</sup>		p	VT <sup>†</sup>		p
	1,2	3,4		$\geq 7$	$\leq 7$	
nHIF-1 $\alpha$	49,5 (16,3-82,3)	39 (19,2-72,6)	0,006	48,6 (27,9-73,9)	43,6 (16,3-82,3)	0,057
cHIF-1 $\alpha$	11,4 (1,4-75)	18,7 (5,2-59,5)	0,006	11,3 (1,4-59,5)	17,5 (2,9-75)	0,009

\*Hypoxia inducible factor

† veličina tumora

& nuklearni gradus

**Tablica 20. Ekspresija HIF<sup>\*</sup>-1 $\alpha$  u odnosu na kliničkopatološke parametre na TMA**

HIF <sup>*</sup> -1 $\alpha$ %	pT <sup>‡</sup>		p	Ki67(%)		p
	1	2,3,4		1	2	
nHIF-1 $\alpha$	48,1 (27,9-73,9)	44,5 (16,3-82,3)	0,165	43,9 (16,3-72,4)	48,1 (21,2-82,3)	0,134
cHIF-1 $\alpha$	11,4 (1,4-42,6)	16,6 (2,9-75)	0,023	14,6 (4,3-75)	11,6 (1,4-46,5)	0,246

\*Hypoxia inducible factor

‡ patološki stadij

#### 4.2.6.4. p 53 i kliničkopatološki parametri

Koristeći Studentov t- test za usporedbu p53 i nuklearnog gradusa nismo našli značajne povezanosti ( $p=0.671$ ).

Veći p53 bio je značajno povezan sa stadijem bolesti kad smo viši stadij grupirali kao 2,3 i 4 ( $p=0,036$ ), kao i sa tumorima većim od 7 cm ( $p=0,007$ ) (Mann-Whitney test).

Ki 67 i p53 nisu bili značajno povezani ( $p=0,351$ ,  $r=0,102$ ) (Pearsonova korelacija)

#### 4.2.6.5. EGFR i kliničkopatološki parametri

EGFR je bio povezan s višim nuklearnim gradusom, većim tumorima u svim istraživanim kategorijama, višim patološkim stadijem bolesti kad se prikazivao kao histoscore, dok se u odnosu na proliferacijski indeks nije našla povezanost. EGFR na nivou gena nije bio značajno povezan sa niti jednim kliničko patološkim parametrom što pokazuje tablica 21.

**Tablica 21. Imunoekspresija EGFR i FISH EGFR u odnosu na kliničkopatološke parametre na TMA**

		NG & 1,2 i 3,4	VT <sup>†</sup>	PT <sup>‡</sup> 1, 2,3,4	Ki67%
		P	P	P	P
%		0.0006	0.015	0.068	0.427
Ekspresija EGFR <sup>*</sup>	HS <sup>§</sup>	0.0002	0.018	0.036	0.353
	HS <sup>§</sup> kontinuirano	0.0005	0.021	0.213	0.436
	FISH <sup>#</sup>	0.777	0.733	0.193	0.597

\*Epidermalni čimbenik rasta

† veličina tumora

‡ patološki stadij

& nuklearni gradus

§ Histoskor

# Fluorescentna in situ hibridizacija

#### 4.3 Preživljenje bolesnika sa SSKBS

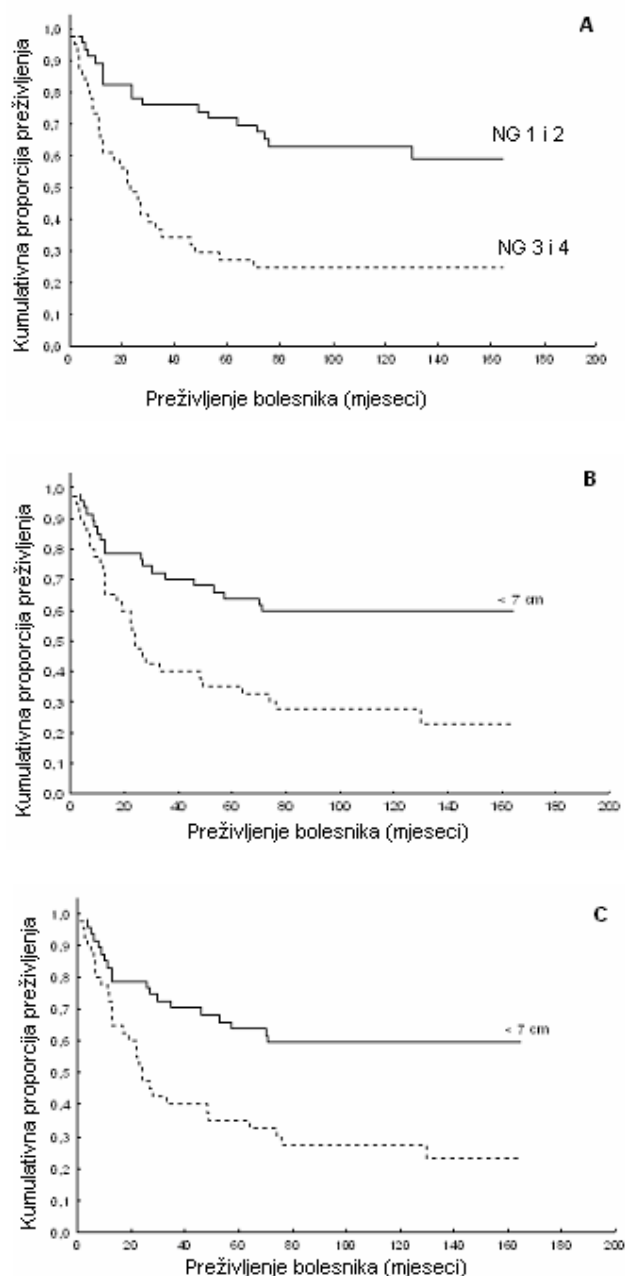
Praćenje je bilo dostupno za 87 pacijenata, a vrijeme preživljavanja bilo je računato od datuma operacije do datuma smrti ili datuma zadnje kontrole s medijanom od 64 mjeseci.



S obzirom da se gradus tumora te stadij bolesti smatraju glavnim prognostičkim parametrima u SKBS, prvo se analizirao njihov impakt na postoperativno preživljenje.

#### 4.3.1. Preživljenje u odnosu na kliničkopatološke parametre

Nađena je značajna inverzna povezanost tumorskog gradusa s preživljenjem ( $p < 0,001$ ) (slika 30.A) ali i s veličinom tumora ( $p = 0,001$ ) (slika 30.B) te stadija bolesti s preživljenjem ( $p = 0,003$ ) (slika 30.C).



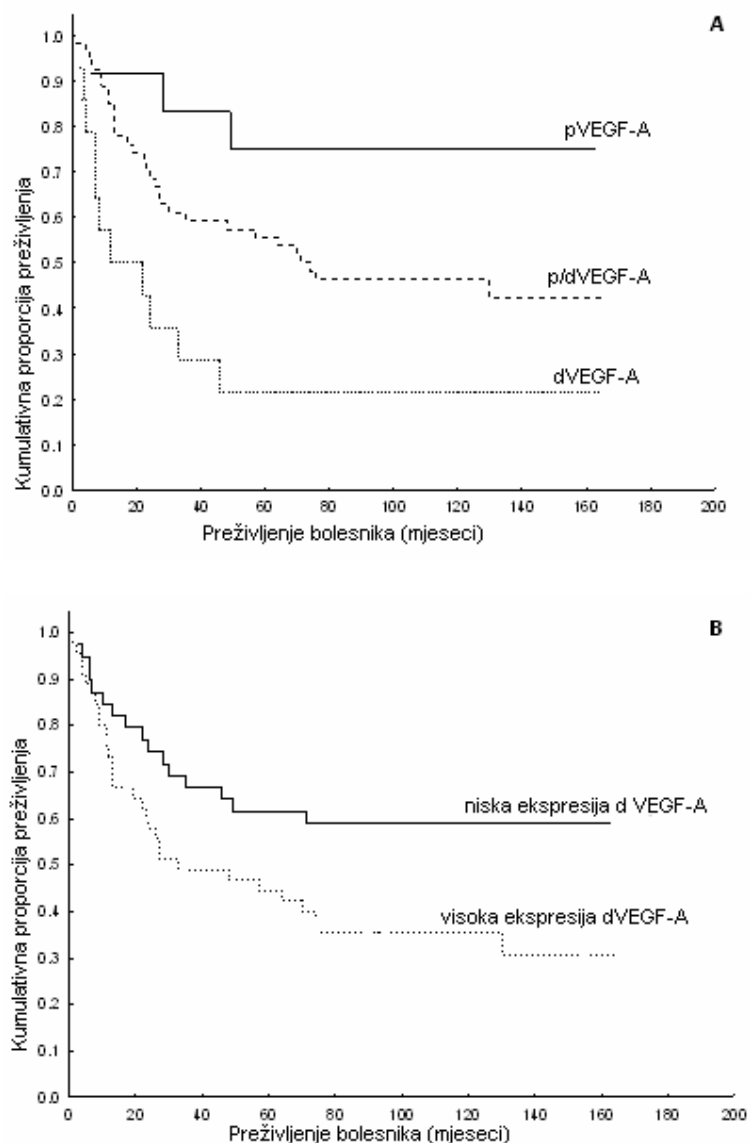
**Slika 30. Preživljenje bolesnika u odnosu na nuklearni gradus(A), veličinu tumora (B) i stadij bolesti (C)**

**4.3.2. Preživljenje bolesnika sa SSKBS u odnosu na parametre imunohistokemijske i FISH analize**

**4.3.2.1. Preživljenje u odnosu na VEGF-A izražaj**

Log – rank test nije pokazao značajnost kod analize ukupnog postotka ispoljenosti VEGF-A i preživljenja bolesnika ( $p=0,374$ ) kao niti kod analize HS preživljenja ( $p=0,572$ ). Ukupna difuzna ekspresija u tumorskim stanicama korelirala je s preživljenjem ( $p=0,048$ ) kao i perimembranozna ekspresija ovog angiogenog čimbenika ( $p=0,028$ ). Chi-square test pokazivao je signifikantno kraće preživljenje u pacijenata s tumorima koji su pokazivali samo difuzno VEGF-A obojenje stanica u usporedbi s pacijentima čiji su tumori pokazivali perimembranozno ili perimembranozno/difuzno obojenje ( $p=0,006$ ). Slika 31.(A) pokazuje postepeno opadanje duljine preživljenja kako se u tumorima pojavljuje difuzno citoplazmatsko obojenje, tj u grupi pacijenata s tumorima sa čisto perimembranoznim obojenjem preživljenje je 75%, preživljenje pacijenata s tumorima s difuznim i perimembranoznim obojenjem opada na 50%, a pacijenti s tumorima s čisto difuznim obojenjem VEGF-A preživljavaju u 21%.

Značenje difuzne citoplazmatske ekspresije VEGF-A u odnosu na preživljenje prikazano je i na slici 31. (B). Log-rank test je pokazao statistički značajnije kraće preživljenje u pacijenata s tumorima koji pokazuju visoki dVEGF-A. Petogodišnje preživljenje tumora koji su pokazivali visoki difuzni citoplazmatski izražaj bilo je 40% u usporedbi s niskim dVEGF-A koje je iznosilo 59%.



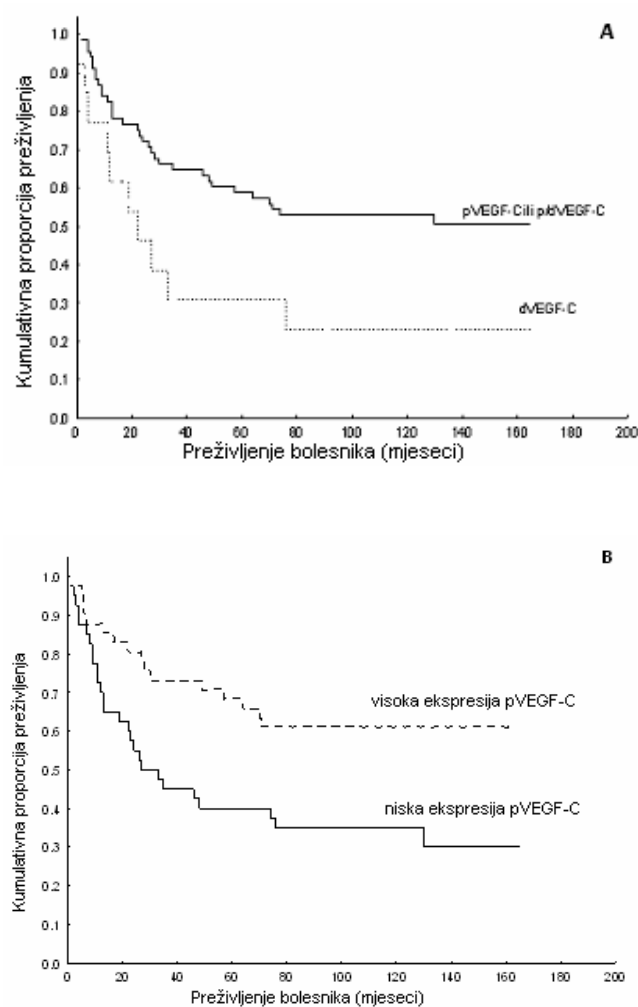
**Slika 31. Kaplan-Meier kumulativna analiza preživljenja u odnosu na pVEGF-A dVEGF-A ili miješano p/d citoplazmatsko obojenje (A) te visoku i nisku dVEGF-A ekspresiju (B)**

#### 4.3.2.2. Preživljenje u odnosu na VEGF-C izražaj

Log-rank test je pokazivao signifikantno kraće preživljenje u pacijenata s tumorima difuzne distribucije VEGF-C u pozitivnim stanicama u usporedbi s bolesnicima koji su imali tumore s perimembranoznim citoplazmatskim obojenjem VEGF-C(  $p=0,040$ ) s petogodišnjim preživljenjem od 54% za tumore s pVEGF-C ili p/d VEGF-C u odnosu na tumore s d VEGF-C kod kojih je preživljenje pacijenata bilo 31% (Slika 32 A).

Za razliku od VEGF-A kod kojega je difuzna citoplazmatska distribucija u tumorskim stanicama bila od prognostičkog značaja, kod VEGF-C imunobojenja viša ekspresija perimembranoznog bojenja ovog proteina u citoplazmi signifikantno je povezana s duljim preživljenjem ( $p=0,008$ ). Petogodišnje preživljenje za ove tumore je bilo 61% u usporedbi s tumorima s niskom ekspresijom perimembranoznog obojenja VEGF-C koje je iznosilo 40%.

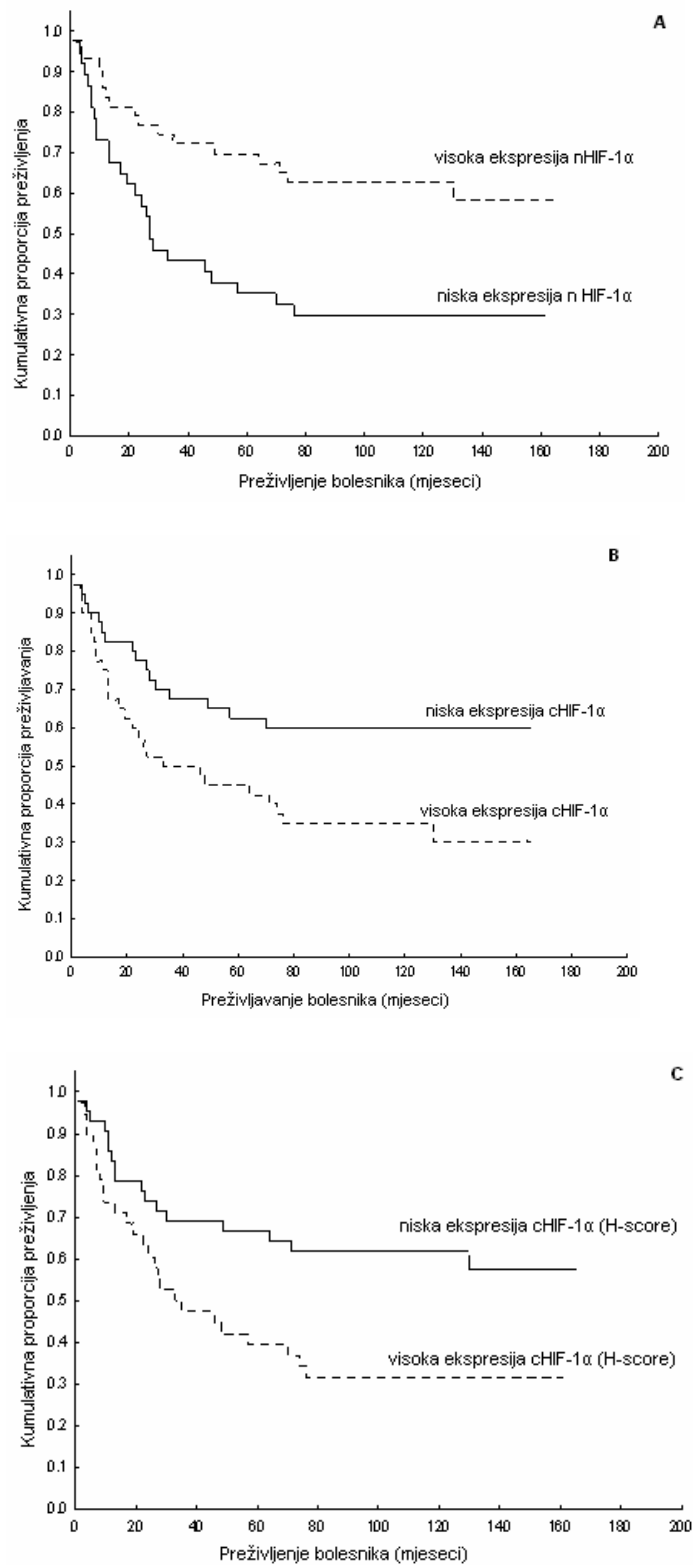
(Slika 32. B).



**Slika 32. Kaplan-Meier kumulativna analiza preživljenja u odnosu na dVEGF-C ili miješano p/dVEGF-C citoplazmatsko obojenje (A) te visoku i nisku dVEGF-C ekspresiju (B)**

#### 4.3.2.3. Preživljenje u odnosu na HIF-1 izražaj

Podjela na nisku i visoku ekspresiju nHIF-1 $\alpha$  te cHIF-1 $\alpha$  pokazala se statistički značajnom i u odnosu na preživljenje Kaplan-Meier-ovom analizom kumulativnog preživljenja. Log-rank test povezuje nisku ekspresiju nHIF-1 $\alpha$  sa signifikantno kraćim preživljenjem ( $p=0,005$ ). Petogodišnje preživljenje je bilo 32% za pacijente čiji su tumori pokazivali nisku nuklearnu ekspresiju HIF-1 $\alpha$  u odnosu na 65% pacijenata sa tumorima visoke ekspresije nHIF-1 $\alpha$ . (slika 33.A) Preživljenje je također značajno kraće kod visokog citoplazmatskog izražaja HIF-1 $\alpha$  ( $p=0,018$ ) . Petogodišnje preživljenje za pacijente s tumorima visoke ekspresije cHIF-1 $\alpha$  je bilo 40 % u odnosu na duži život pacijenata s tumorima niske ekspresije cHIF-1 $\alpha$  od 60%. (slika 33.B). Kad se c HIF-1 $\alpha$  prikazivala kao histoskor log-rank test je pokazivao signifikantno kraće ukupno preživljenje pacijenata s tumorima visoke i intenzivne citoplazmatske ekspresije HIF-1 $\alpha$  ( $p=0.015$ ). 5- godišnje preživljenje je bilo 62% za pacijente čiji su tumori pokazivali nisku cHIF-1 $\alpha$  ekspresiju slabijeg inteziteta, u usporedbi s 37% preživljenja čiji su tumori ispoljavali visoki postotak citoplazmatske ekspresije HIF-1 $\alpha$  jačeg intenziteta (slika 33.C).



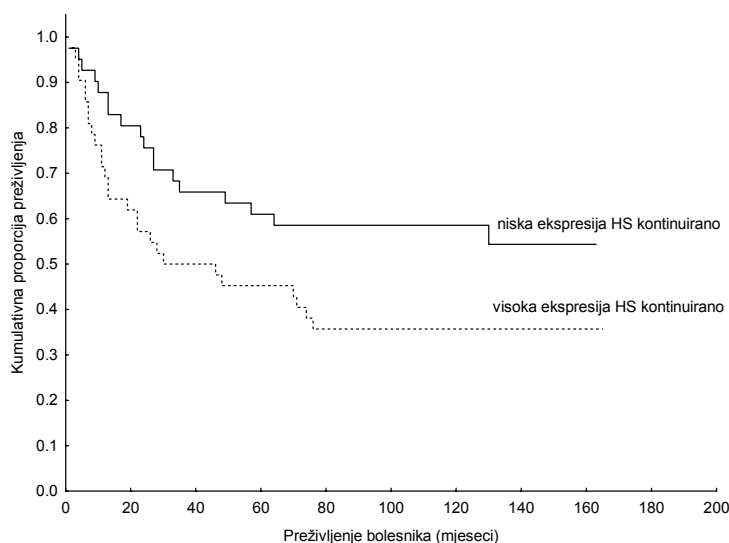
**Slika 33. Kaplan-Meier kumulativna analiza preživljenje u odnosu na n i cHIF-1 $\alpha$  (A,B) te na HS cHIF-1 $\alpha$  (C)**

#### 4.3.2.4. Preživljenje u odnosu na p53 izražaj

Log-rank test nije povezao preživljenje i p53 podijeljen medianom na viši i niži postotak pozitivnih stanica u SSKBS ( $p=0,994$ ) .

#### 4.3.2.5. Preživljenje u odnosu na EGFR izražaj

Log- rank test je pokazao da histoskor kontinuiranog membranskog imunoobojenja značajno korelira sa preživljenjem ( $p=0,046$ ) dok postotak pozitivnih stanica i ukupni histoskor nisu pokazali povezanost s preživljenjem. (% ,  $p=0,168$ ; HS,  $p=0,074$ ). Niska ekspresija HS kontinuirano ima kumulativnu proporciju preživljenja od 59%, a visoka ekspresija HS kontinuirano ima kumulativnu proporciju preživljenja od 40% što prikazuje slika 34.



#### Slika 34. EGFR prikazan kao histoskor kontinuiranog membranskog obojenja

Histoscore kontinuiranog membranskog imunoobojenja značajno korelira sa preživljenjem te tumori sa niskom ekspresijom HS kontinuirano imaju bolje preživljenje u odnosu na visoki EGFR imunoizražaj HS kontinuirano

### 4.3.3. Multivarijatna analiza preživljenja (Cox regresijski model)

#### 4.3.3.1. Analiza za VEGF-A

Za dVEGF-A visoki/niski izražen kroz postotak proizlazi da nije neovisan prognostički pokazatelj ( $p=0,138$ ) kada se u izračun uvrsti NG12 i pT12, odnosno, isto ispada kada se za pT uzme podjela na 1 naspram 2,3,4 ( $p=0,189$ ). Bilo za pT1/2 ili pT1/1,2,3,4 proizlazi također da nije neovisni prognostički pokazatelj iako je  $p<0,05$ , jer izračunati relativni rizik nije statistički značajan na razini 95%, (interval pouzdanosti uključuje 1.) Jedino za NG(1/2) ispada da je neovisan prognostički pokazatelj (Tablica 22).

**Tablica 22. Multivarijatna analiza prognostičkih faktora i dVEGF-A (%) u bolesnika sa SSKBS-om.**

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p
dVEGF-A visoki/niski (%)	1,3	0,9-2	0,138
pT12	2,7	0,9-7,4	0,013
NG12	3	1,7-5,3	0,005

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p
dVEGF-A visoki/niski (%)	1,3	0,9-2	0,189
pT1/2,3,4	1,5	1-2,4	0,016
NG12	3	1,7-5,3	0,002

Za VEGF-A p/d izražen kroz dvije kategorije proizlazi da nije neovisan prognostički pokazatelj iako je  $p<0,05$  ( $p=0,039$ ) kada se u izračun uvrsti NG12 i pT12, jer izračunati relativni rizik od 2,8 nije statistički značajan na razini 95%, jer interval pouzdanosti uključuje 1. Također nije neovisan prognostički pokazatelj kada se za pT uzme podjela na



1 naspram 2,3,4 ( $p=0,101$ ). Za pT i NG komentar vrijedi kako je gore navedeno (Tablica 23) .

**Tablica 23. Multivarijatna analiza prognostičkih faktora i p/dVEGF-A u bolesnika sa SSKBS-om.**

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
p/dVEGF-A 12	2,8	1-7,7	0,039
pT12	2,7	0,9-7,4	0,017
NG12	3	1,7-5,3	0,006

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
p/dVEGF-A 12	2,8	1-7,7	0,101
pT1/2,3,4	1,5	1-2,4	0,028
NG12	3	1,7-5,3	0,002

**Preživljavanje i VEGF-A p/d 1,2,3 ( $\chi^2$ ):**  $p=0,019$  (1-najduže, 2-srednje, 3-najkraće)

Za VEGF-A p/d izražen kroz tri kategorije preživljenja, kada se uspoređuje kategorija miješane ekspresije **p/dVEGF-A proizlazi da je neovisan prognostički pokazatelj** ( $p=0,019$ ), kada se u izračun uvrsti NG12 i pT12 s naglaskom da je relativni rizik statistički značajan na razini 95 %. Kada se za pT uzme podjela na 1 naspram 2,3,4, tada je p blizu statističke značajnosti ( $p=0,056$ ). Za pT i NG komentar vrijedi kako je gore navedeno (Tablica 24).

**Tablica 24. Multivarijatna analiza prognostičkih faktora i p/dVEGF-A u bolesnika sa SSKBS-om.**

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
p/dVEGF-A 1,2,3	3,6	1,2-10,2	0,019
pT12	2,7	0,9-7,4	0,019
NG12	3	1,7-5,3	0,014

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
p/dVEGF-A 1,2,3	3,6	1,2-10,2	0,056
pT1/2,3,4	1,5	1-2,4	0,044
NG12	3	1,7-5,3	0,003

#### 4. 3.3.2. Analiza za VEGF-C

Za pVEGF-C visoki/niski izražen kroz postotak proizlazi da nije neovisan prognostički pokazatelj ( $p=0,059$ , osim toga interval pouzdanosti uključuje 1 pa relativni rizik nije statistički značajan na razini 95%) kada se u izračun uvrsti NG12 i pT12, odnosno, isto ispada kada se za pT uzme podjela na 1 naspram 2,3,4 ( $p=0,154$ ). Bilo za pT12 ili pT1/1,2,3,4 proizlazi također da nije neovisni prognostički pokazatelj iako je  $p<0,05$ , jer izračunati relativni rizik nije statistički značajan na razini 95%, jer interval pouzdanosti uključuje 1. Jedino za NG12 ispada da je neovisan prognostički pokazatelj (Tablica 25).

**Tablica 25. Multivarijatna analiza prognostičkih faktora i pVEGF-C (%) u bolesnika sa SSKBS-om.**

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
pVEGF-C visoki/niski (%)	0,8	0,5-1,1	0,059
pT12	2,7	0,9-7,4	0,016
NG12	3	1,7-5,3	0,007

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
pVEGF-C visoki/niski (%)	0,8	0,5-1,1	0,154
pT1/2,3,4	1,5	1-2,4	0,033
NG12	3	1,7-5,3	0,001

Za VEGF-C p/d izražen kroz dvije kategorije proizlazi da nije neovisan prognostički pokazatelj ( $p=0,097$  i interval pouzdanosti uključuje 1) kada se u izračun uvrsti NG12 i pT12. Isto nije neovisan prognostički pokazatelj kada se za pT uzme podjela na 1 naspram 2,3,4 ( $p=0,402$ ). Za pT i NG komentar vrijedi kako je gore navedeno (Tablica 26).

**Tablica 26. Multivarijatna analiza prognostičkih faktora i p/dVEGF-C u bolesnika sa SSKBS-om.**

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
p/dVEGF-C 12	1,4	0,7-2,9	0,097
pT12	2,7	0,9-7,4	0,014
NG12	3	1,7-5,3	0,004

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
p/dVEGF-C 12	1,4	0,7-2,9	0,402
pT1/2,3,4	1,5	1-2,4	0,030
NG12	3	1,7-5,3	0,001

#### 4.4.3.3. Analiza za HIF-1 $\alpha$

Za nHIF-1 $\alpha$  visoki/niski izražen kroz postotak proizlazi da nije neovisan prognostički pokazatelj ( $p=0,114$ ) kada se u izračun uvrsti NG12 i pT12, odnosno, isto ispada kada se za pT uzme podjela na 1 naspram 2,3,4 ( $p=0,175$ ). Bilo za pT12 ili pT1/1,2,3,4 proizlazi također da nije neovisan prognostički pokazatelj iako je  $p<0,05$ , jer izračunati relativni rizik nije statistički značajan na razini 95% (interval pouzdanosti uključuje 1). Jedino za NG12 ispada da je neovisan prognostički pokazatelj (Tablica 27).

**Tablica 27. Multivarijatna analiza prognostičkih faktora i nHIF-1 $\alpha$  (%) u bolesnika sa SSKBS-om.**

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
nHIF-1 $\alpha$ (%)	0,5	0,3-0,8	0,114
pT12	2,7	0,9-7,4	0,017
NG12	3	1,7-5,3	0,017

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
nHIF-1 $\alpha$ (%)	0,5	0,3-0,8	0,175
pT1/2,3,4	1,5	1-2,4	0,021
NG12	3	1,7-5,3	0,005

Za cHIF-1 $\alpha$  visoki/niski izražen kroz postotak proizlazi da nije neovisan prognostički pokazatelj ( $p=0,158$ ) kada se u izračun uvrsti NG12 i pT12, odnosno, isto ispada kada se za pT uzme podjela na 1 naspram 2,3,4 ( $p=0,218$ ). Bilo za pT12 ili pT1/1,2,3,4 proizlazi također da nije neovisan prognostički pokazatelj iako je  $p<0,05$ , jer izračunati relativni rizik nije statistički značajan na razini 95%, (interval pouzdanosti uključuje 1). Jedino za NG12 ispada da je neovisan prognostički pokazatelj (Tablica 28).

**Tablica 28. Multivarijatna analiza prognostičkih faktora i cHIF-1 $\alpha$ (%) u bolesnika sa SSKBS-om.**

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
cHIF-1 $\alpha$ (%)	1,3	0,8-1,9	0,158
pT12	2,7	0,9-7,4	0,046
NG12	3	1,7-5,3	0,003

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
cHIF-1 $\alpha$ (%)	1,3	0,8-1,9	0,218
pT1/2,3,4	1,5	1-2,4	0,045
NG12	3	1,7-5,3	0,001

Za **cHIF-1 $\alpha$**  visoki/niski izražen kroz **HS** proizlazi da je **neovisan prognostički pokazatelj (p=0,023)** kada se u izračun uvrsti NG12 i pT12. Relativni rizik iznosi 1,7 što znači da bolesnici čiji tumori imaju nisku ekspresiju cHIF-1 $\alpha$  (HS) imaju 1,7 puta veće šanse preživljavanja do 55 mjeseci od bolesnika s visokom ekspresijom cHIF-1 $\alpha$  (HS). Kada se za pT uzme podjela na 1 naspram 2,3,4, tada ispada p blizu statističke značajnosti (p=0,056), a za relativni rizik vrijedi isto. Za pT i NG komentar vrijedi kako je gore navedeno (Tablica 29).

**Tablica 29. Multivarijatna analiza prognostičkih faktora i cHIF-1 $\alpha$  H-score u bolesnika sa SSKBS-om.**

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
cHIF-1 $\alpha$ (H-score)	1,7	1,1-2,7	0,023
pT12	2,7	0,9-7,4	0,008
NG12	3	1,7-5,3	0,023

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
cHIF-1 $\alpha$ (H-score)	1,7	1,1-2,7	0,056

pT1/2,3,4	1,5	1-2,4	0,018
NG12	3	1,7-5,3	0,007

#### 4.4.3.4. Analiza za EGFR

Za EGFR HS kontinuirano visoki/niski proizlazi da nije neovisan prognostički pokazatelj ( $p=0,175$ ) kada se u izračun uvrsti NG12 i pT12 pri čemu je pT1=1. Za pT1/2,3,4 proizlazi također da nije neovisan prognostički pokazatelj iako je  $p<0,05$ , jer izračunati relativni rizik nije statistički značajan na razini 95%, jer interval pouzdanosti uključuje 1. Jedino za NG12 ispada da je neovisan prognostički pokazatelj (Tablica 30).

**Tablica 30. Multivarijatna analiza prognostičkih faktora i EGFR HS kontinuirano u bolesnika sa SSKBS**

Varijabla	Relativni rizik	95% interval pouzdanosti	p vrijednost
EGFR HS kontinuirano	1,3	0,9 – 1,9	0,175
pT1/2,3,4	1,5	1-2,4	0,009
NG12	3	1,7-5,3	0,002

## ***5. DISKUSIJA***

Koncept razvoja antiangiogene terapije, predložen još prije tri dekade, doveo je do razumijevanja brojnih molekularnih događaja koji su odgovorni za razvoj i rast tumorske vaskulature. Ključni mehanizmi još nisu do kraja razjašnjeni, posebice u karcinomu bubrega koji, za razliku od tumora dojke, pluća ili crijeva, u velikim kliničkim studijama kod primjene «pametnih» molekula u adjuvantnoj terapiji ne reagiraju signifikantno boljim preživljenjem. Iako veliki broj pretkliničkih i kliničkih studija koje razvijaju antiangiogenu terapiju koriste karcinom bubrežnih stanica kao idealan model za evaluaciju novih strategija zbog njegove bogate vaskularizacije i visoke ekspresije angiogenih čimbenika kako u tumoru tako i u serumu pacijenata, uspješno liječenje tumora bubrežnih stanica još uvijek počiva na ranom otkrivanju i dobrom kirurškom tretmanu (81). Već je rečeno da se 1/3 pacijenata prezentira s metastatskom bolešću, a 20-30% pacijenata razvija metastaze nakon nefrektomije što rezultira smrtnim ishodom zbog nefektivne terapije koja bi spriječila relaps bolesti nakon zahvata unatoč primjeni citotoksične kemoterapije i imunoterapije (106). U novije vrijeme antiangiogena terapija značajno učestvuje u poboljšanju terapije ovog refrakternog karcinoma no neki pacijenti uopće ne reagiraju na liječenje. Iako je metastatski SSKBS liječen antitijelima protiv solubilnog VEGF-a pokazivao u studijama dulji period bez tumorske progresije u odnosu na placebo grupu, liječenje ovakvom terapijom nije donijelo korist glede ukupnog preživljenja. Ovakva onkološka terapija je u sadašnjem trenutku terapija druge linije lijekova (120). Obećavajući rezultati kako pretkliničkih tako i kliničkih studija koje su na tragu otkrivanja regulacijskih mehanizama i signalnih puteva angiogenih čimbenika govore u prilog kombiniranih terapija sa blokadom angiogeneze na nekoliko nivoa u tumorskoj stanici, ekstracelularnom matriksu te endotelnim stanicama novostvorenih

krvnih žila. Tako razvoj antiangiogene terapije slijedi obično tri pravca: inhibiciju produkcije angiogenih čimbenika od strane tumorskih stanica, neutralizaciju slobodnih angiogenih proteina pomoću antitijela ili njihovim «zarobljavanjem», te inhibicijom vezanja angiogenih proteina na endotelne stanice, odnosno indukcijom apoptoze endotela. U današnje vrijeme razvijene kao lijekovi i odobrene od FDA tzv «male molekule», usmjerene protiv nekoliko tirozin kinaza receptora, izazivaju blokadu aktivnosti bilo na nivou receptora, liganda ili neke od stepenica signalnog puta . Pristup u liječenju koji istovremeno uključuje nekoliko ciljnih molekula se postavio kao nova paradigma u istraživanjima i razvoju «pametnih» lijekova. (121,122). Na 33-ćem kongresu evropskog udruženja za medicinsku onkologiju održanom u Štokholmu u rujnu 2008 godine Giuseppe Giaccone MD (Bethesda,USA) zaključio je: «da je osnovno selektirati pacijente prema ponuđenim ciljnim lijekovima za njihovu bolest. Selekcija uključuje one pacijente za koje smo sigurni da će reagirati na terapiju. Tako će se izbjeći nepotrebne nus pojave i trošak kod onih bolesnika koji ne reagiraju (123). Selekcija pacijenata koji se odabiru u kliničkim studijama za odabir ciljne terapije uglavnom počiva na prethodnoj nefrektomiji, uznapredovaloj bolesti i histološkoj slici SSKBS baziranoj na biologiji pVHL inaktivacije i posljedična VEGF prekomjerne ekspresije. U skupini SSKBS koje smo analizirali standardni prognostički faktori kao što su veličina tumora, nuklearni gradus i stadij tumora su inverzno korelirali sa preživljenjem što je u skladu s literaturnim podacima (99,124). Za odabir pacijenata je potrebno osigurati dijagnostičke testove koji će opravdati davanje ciljnih lijekova.

Dijagnostički testovi počivaju na razumijevanju djelovanja angiogenih čimbenika i receptora, napose VEGF-A i njegovih receptora, protiv kojih su i stvoreni ciljni lijekovi. Unatoč početnim uspjesima u liječenju uznapredovalog SSKBS antiangiogenom terapijom, iznenađujuće se malo zna o ekspresiji ciljnih molekula u renalnim tumorima te



o mikrovaskulaturi. (125). Nadalje, zajedno s kliničkim razvojem ciljnih terapija protiv VEGF-A te VEGF-R javila se i hitna potreba za razvojem biomarkera koji će predvidjeti odgovor na ove lijekove kao i odrediti grupu pacijenata koji će imati koristi od ove terapije.

Imunohistokemijska analiza može biti dobra metoda kako za identifikaciju tako i za vrjednovanje biomarkera. U našoj studiji smo na standardnim tkivnim rezovima pokazali da normalni renalni parenhim konstitutivno eksprimira VEGF-A homogeno i ograničeno na citoplazmu tubularnog epitela, glatko mišićne stanice i makrofage u intersticiju te mezangij u glomerulima poput nekih autora (126, 127,128). U nekim studijama ovakva ekspresija VEGF-A u normalnom parenhimu nije nađena (129). U SSKBS uočili smo heterogenu i prekomjernu ekspresiju ovog angiogenog čimbenika rasta u tumorskim stanicama koja je bila signifikantno povezana sa patološkim i kliničkim parametrima relevantnim za prognozu. Viši nuklearni gradus i veći tumori poznati kao neovisni prognostički faktori značajno su korelirali sa ekstenzivnom ekspresijom VEGF-A i to iznad 75 % pozitivnih tumorskih stanica. Ovi rezultati se slažu s rezultatima prethodnih studija koje ukazuju na povezanost VEGF-A s progresijom tumora, te na njegovo prognostičko značenje (130, 131, 132, 133,134). Rezultati studija koje su uočile signifikantnu razliku u nivou VEGF-A u serumu pacijenata sa SSKBS, ELISA testom, u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu također indirektno ukazuju na važnost ovog čimbenika kao prognostičkog markera korisnog za praćenje relapsa bolesti (135,136,137). Naša studija je pokazala važnost ovog čimbenika rasta u progresiji tumora ne samo kroz postotak tumorskih stanica nego i kroz način ekspresije VEGF-A u citoplazmi tumorskih stanica slično nalazu Yildiz-a i koautora (134). Naime, podjela na perimembranoznu i difuznu ekspresiju unutar citoplazme rezultirala je statistički značajnom povezanošću difuznog citoplazmatskog izražaja VEGF-A sa višim nuklearnim gradusom, višim

proliferativnim indeksom i višim stadijem bolesti. Jakobsen je također uočio ovakvu distribuciju VEGF-A u citoplazmi tumorskih stanica ali je perimembranozni način ekspresije protumačio kao artefakt koji se javlja kod dugog skladištenja tumorskog materijala uklopljenog u parafinske blokove i nije dalje evaluiran. (57). Nizozemski autori Baldewijns i suradnici također su prepoznali dvojak način ekspresije VEGF-A u citoplazmi te opisuju predominantno membransko obojenje u tumorima niskog gradusa dok je difuzno, gušće citoplazmatsko intratumoralno VEGF-A imunoobojenje bilo prisutno u tumorima višeg nuklearnog gradusa ali u radu dalje ne procjenjuju ovu distribuciju VEGF-A. (138). Interesantan nalaz je i inverzna povezanost broja krvnih žila na jedinicu površine tumora u ispitivanoj skupini SSKBS sa VEGF-A imunoizražajem kao što je primijećeno u nekoliko istraživanja (114,139,140). Nedavna studija Kluger i suradnika također je dokazala da pacijenti sa bolje vaskulariziranim tumorima bubrega i nižom ekspresijom VEGF –a u tumorskim stanicama duže preživljavaju (125). Spomenuta studija nizozemaca također značajno korelira niži MVD sa višim nuklearnim gradusom. (138). To je u suprotnosti s većinom studija koje povezuju veću gustoću krvnih žila u tumoru sa lošijom prognozom pacijenata s tumorima bubrega (141, 142). Neki autori smatraju gustoću vaskularizacije diferencijacijskim parametrom. Naime karcinom bubrežnih stanica imitira formiranje tubula koji su blisko povezani s peritubularnim kapilarama pa je moguće da viši stupanj vaskularizacije u tumoru reflektira nešto slično normalnoj tkivnoj organizaciji renalnog tubularnog sustava. To podržava i opažanje da mikrovaskularne endotelne stanice mogu utjecati na tubulogenezu posredstvom djelovanja VEGF-A (114). Ako je gustoća krvnih žila diferencijacijski marker onda je nizak broj krvnih žila u tumorima visokog gradusa razumljiv nalaz, pogotovo zbog razvoja nepravilnog vaskularnog korita i velikih vaskularnih kanala izrazite propusnosti koji se često viđaju u velikim tumorima. (143). Kontradiktorni rezultati koji se tiču angiogeneze

u KBS često se objašnjavaju različitim metodologijama i kriterijima za evaluaciju broja krvnih žila u različitim studijama, a naše su pretpostavke da uzrok počiva i u heterogenosti arhitekturnih karakteristika selektiranih tumora. Naime, između tri dominantna histološka tipa KBS, SSKBS je općenito više vaskulariziran nego papilarni ili kromofobni tip KBS. Ova vaskularizacija je najviše prisutna zbog inaktivacije VHL tumor supresorskog gena koja se nalazi u oko 50-80% sporadičnih SSKBS (144). Osim toga, već se neko vrijeme zna da mikrovaskularni kanali mogu nastati uz sudjelovanje agresivnih tumorskih stanica koje imitiraju endotel u ekspresiji specifičnih gena i biološkoj funkciji. Takvo «de novo» stvaranje tumorske vaskularizacije bez proliferacije endotela i neovisno od procesa angiogeneze nazvano je vaskulogena mimikrija. Metoda imunohistokemijske detekcije endotelnih stanica koju smo koristili za identifikaciju tumorske mikrocirkulacije vjerojatno nije pogodna za tumore koji eksprimiraju vaskulogenu mimikriju. Nasu i autori su primijetili da je ovaj fenomen povezan sa agresivnim fenotipom tumorskih stanica koje pasivno oblažu razgranatu mrežu mikrocirkulacije bez sudjelovanja stromalnih ili endotelnih stanica, a broj krvnih žila detektiranih putem obojenja endotelnih stanica je ekstremno mali što se slaže sa rezultatima naše studije. Još nije sasvim jasno da li tumorske stanice imaju kakvu aktivnu ulogu u ustanovljenju takve mikrocirkulacije. (145,146). Spomenuti autori Kluger i suradnici su također ustanovili da je gustoću krvnih žila bolje određivati na standardnim tkivnim rezovima, kao u našoj studiji, u odnosu na TMA jer su uspoređujući dvije ispitivane areje istog tumora našli signifikantnu razliku u broju krvnih žila. Takav nalaz stavlja u prvi plan heterogenost samog tumora i mogućnost da različite areje istog tumora imaju različiti broj krvnih žila što se pregledom cjelokupnog tkivnog reza da ustanoviti u vidu «vrućih točaka» (125).

Tumorske mikroareje su se u našoj studiji pokazale dobrim alatom u ispitivanju ostalih parametara relevantnih u ekspresiji VEGF-a. Razliku smo našli kod usporedbe proliferacijskog indeksa i ekspresije VEGF-A kada na TMA nismo našli značajnu povezanost između ta dva parametra koju smo našli na standardnim rezovima, pa smo se zapitali da li su TMA doista dobra metoda za određivanje proliferacijskog indeksa. Pregledom literature Ki67 u tumorima bubrega u multivarijantnoj analizi nije se pokazao kao neovisni prognostički faktor i u više studija bio je nizak kao i u našem istraživanju. (147,148). Rezultati analize ekspresije VEGF-A na TMA bili su slični kao i na standardnim rezovima što odgovara studiji Jakobsena i autora (57). VEGF je ispoljavao imunoreaktivnost u tumorima heterogeno kao citoplazmatsku ekspresiju različitog intenziteta i postotka u tumorima, te se također pri statističkom izračunu uzimala u obzir kao perimembranozna i/ili difuzna. Raspodjela prema postotku perimembranoznog ili difuznog obojenja u citoplazmi pokazala se opet i na TMA statistički puno važnija od ukupnog postotka pozitivnih stanica ili intenziteta udruženog s postotkom prikazanog kao histoskor. I na TMA viši postotak VEGF-A te viši histoskor bio je povezan sa višim nuklearnim gradusom i višim stadijem bolesti dok veličina tumora i proliferacijski indeks nisu pokazivali značajnu povezanost. Perimembranozna ekspresija VEGF-A nije pokazivala statistički značajnu korelaciju niti sa jednim kliničkopatološkim parametrom. Nasuprot tome difuzna citoplazmatska ekspresija VEGF –A pokazala se kao dodatni prognostički parametar jer je signifikantno korelirala i sa nuklearnim gradusom i sa veličinom tumora i sa patološkim stadijem. I kod usporedbe s preživljenjem način citoplazmatske ekspresije je bio značajan jer je perimembranozna distribucija imunoobojenja citoplazme bila značajno povezana sa dužim preživljenjem dok je kod difuzne citoplazmatske ekspresije bilo obratno. Čak štoviše, statistička analiza je pokazala da pojavom difuznog imunoobojenja u citoplazmi tumorskih stanica dolazi do

značajnog postepenog smanjenja preživljenja pacijenata u odnosu na pacijente s tumorima koji pokazuju čisto perimembranoznu ekspresiju. Ova se značajnost zadržala i u multivarijatnoj analizi s preživljenjem podijeljenim u tri kategorije (najduže srednje i najkraće) kada podjela na perimembranozno i difuzno citoplazmatsko imunoobojenje VEGF-A u odnosu na nuklearni gradus i stadij bolesti pokazuje status neovisnog prognostičkog parametra. Ovi rezultati studije su jedinstveni u literaturi i dokazuju da je način distribucije VEGF-A unutar tumorske stanice ne samo važan u prognostičkom smislu već zasigurno odražava i mehanizam djelovanja samog čimbenika rasta. Jakobsen je u svojoj studiji primijetio ovakvu distribuciju imunoobojenja u citoplazmi tumorskih stanica te također dobio značajnu korelaciju VEGF ekspresije sa tumorskim stadijem ali i sa veličinom tumora koji mi nismo dobili. U multivarijatnoj analizi VEGF se u njihovoj studiji nije pokazao neovisnim prognostičkim čimbenikom kao niti u drugim studijama koje su pokušavale dati takvo značenje ovom angiogenom faktoru. (57,133,134). Mathers i suradnici sugeriraju da jaka citoplazmatska ekspresija VEGF u tumorima znači klinički agresivniji tip SSKBS unutar grupe tumora ograničenih na bubreg (149). Zaista, teško je s obzirom na različiti VEGF-A imunohistokemijski fenotip stanica prepoznati biološki različite tumorske klonove koji bi bili od praktične kliničke važnosti. Naša opažanja povišene regulacije VEGF mRNA u tumorskim stanicama koje pokazuju perimembransku proteinsku distribuciju VEGF-A ukazuju na važnost prepoznavanja načina citoplazmatske ekspresije što se vjerojatno može povezati s različitim angiogenim potencijalom tumorskih stanica u poticanju neovaskularizacije. Također je teško odrediti nije li način imunohistokemijske ekspresije izraz dinamične lokalizacije VEGF-A u stanici. Ovaj angiogeni čimbenik usporedili smo s drugim članom familije, VEGF-C, provjeravajući njihovu povezanost i sudjelovanje u angiogenezi. VEGF-C je generalno prihvaćen kao čimbenik limfangiogeneze koji u tumorima korelira sa širenjem bolesti u

limfne čvorove (150,151,152). VEGF-C ima centralnu domenu homolognu s VEGF-A ali se razlikuje po prisutnosti propeptida na krajevima. Neke studije tvrde da je VEGF-C ekspresija stimulirana putem faktora rasta kao što su čimbenik rasta deriviran iz trombocita te epidermalnim čimbenikom rasta a ne hipoksijom (50,51), druge pak dokazuju da hipoksija povećava broj transkripata koji kodiraju VEGF-C i -D te njihov receptor (52). VEGF-C i D su važni u međustaničnoj signalizaciji u procesu angiogeneze, moguće regrutirani u procesu već potaknute angiogeneze putem VEGF-A. Štoviše, interakcija VEGF-C / VEGFR-3 može predstavljati alternativan, odvojeni put angiogene stimulacije (55). U normalnom tkivu bubrega slično kao i kod VEGF-A opazili smo homogenu ekspresiju ovog čimbenika rasta također u citosolu tubularnih stanica endotelu, mezangiju i makrofazima što je sukladno podacima iz literature. VEGF-C promovira preživljenje podocita, a zajedno s VEGF-A najvjerojatnije koordinira sinhronizirani razvoj tubularne i vaskularne arhitekture koja je važna za formaciju nefrona i održavanje njegove funkcije (153,127,128). Ne nalazi se mnogo literaturnih podataka o ekspresiji VEGF-C u SSKBS. Gunningam i suradnici nisu našli značajno povišenu ekspresiju VEGF-C u tumorima u usporedbi s normalnim parenhimom bubrega (154). Leppert i suradnici nisu našli razlike u ekspresiji ovog čimbenika rasta između tri glavna histotipa KBS iako je VEGFR-3, glavni receptor za VEGF-C, bio prekomjerno eksprimiran samo u SSKBS (155). U tumorima smo, kao i kod VEGF-A, opazili heterogenu distribuciju sa naglašenom perimembranoznom ili difuznom citoplazmatskom ekspresijom. Statistički značajna povezanost između ova dva angiogena čimbenika dobivena jedino kod usporedbe difuznog citoplazmatskog imunoobojenja VEGF-A i VEGF-C. U svojim istraživanjima ekspresije VEGF-A, VEGF-C i njihovih receptora u različitim tumorima Bando i suradnici su otkrili da je najveća ekspresija receptora za VEGF-C prisutna upravo u tumorima bubrega ali i iznenađujući nalaz jače povezanosti ovoga receptora sa

slobodnim VEGF-A nego s VEGF-C (156). Nedavna studija Takahishe i suradnika nije pokazala signifikantnu povezanost VEGF-C sa kliničkopatološkim parametrima. (157). Mi nismo u našoj studiji također našli povezanost ukupne ekspresije VEGF-C sa ovim parametrima relevantnim za prognozu. Statistička značajnost se međutim dobila kroz analizu distribucije citoplazmatskog VEGF-C obojenja pa je i difuzna i perimembranozna ekspresija VEGF-C u citoplazmi tumorskih stanica značajno korelirala s različitim kliničkopatološkim parametrima svrstavajući tumore s perimembranskim obojenjem VEGF-C u bolju prognostički skupinu. Tumori s difuznim citoplazmatskim obojenjem pokazivali su povezanost sa višim nuklearnim gradusom, većim tumorima i višim stadijem bolesti tj parametrima lošije prognoze. To se potvrdilo i kod analize preživljenja jer su pacijenti s tumorima difuzne ekspresije VEGF-C pokazivali značajno kraće petogodišnje preživljenje od 31% u odnosu na pacijente s tumorima perimembranozne citoplazmatske ekspresije od 54%. Ipak, u multivarijantnoj analizi ovaj čimbenik se nije održao kao neovisni prognostički čimbenik.

Signalni putevi koji povećavaju ekspresiju VEGF-A centralnu ulogu u regulaciji pozitivne povratne sprege ovog čimbenika rasta pridaju sustavu HIF-a. Hidroksilacija HIF-1 $\alpha$  u hipoksiji je inhibirana te dolazi do stabilizacije i akumulacije HIF-1 $\alpha$  te posljedične indukcije aktivnosti ovoga spoja. Već je spomenuto da vezanje VEGF-a za receptore potiče nekoliko signalnih puteva u vidu aktivacije mitogen aktivirajućih protein kinaza RAS, RAF, MEK do MAPK s jedne strane, a s druge strane potiče signalni put phosphoinositidil 3-kinaze koja preko aktivacije protein kinaze B(AKT) regrutira mTOR. Protein kinaza kaskada omogućuje utjecaj ovih čimbenika rasta na progresiju SSKBS kroz proliferaciju, preživljenje, diferencijaciju, migraciju te adheziju tumorskih i endotelnih stanica te kroz angiogenezu uz akumulaciju HIF sustava u hipoksiji. Većina SSKBS demonstrira inaktivaciju funkcije pVHL pa akumulacija HIF sustava može

nastati i neovisno o ovim signalnim putevima, u normoksičnim uvjetima te kao transkripcijski faktor izazvati pojačanu produkciju VEGF-a, PDGF te TGF  $\alpha$  (109). Tako HIF-1 $\alpha$  zajedno sa podjedinicom HIF-1  $\beta$ , konstitutivnim nuklearnim proteinom, dobiva na važnosti ne samo kao stimulator angiogeneze nego i promotor progresije. U normalnom renalnom parenhimu HIF-1 $\alpha$  nismo našli pozitivno imunoobojenje niti u glomerulima niti u tubulointersticiju što se slaže s nalazom Di Cristofana i suradnika (158). U SSKBS ekspresija se detektirala kao nuklearno/citoplazmatsko obojenje različitog intenziteta od slabe preko umjerene do snažne reakcije. Neki autori su zapazili da je ekspresija HIF-1 $\alpha$  u tumorima bubrežnih stanica značajno viša od ekspresije u peritumoralnom bubrežnom parenhimu (159). Nekoliko stotina gena je aktivirano u hipoksiji a veliku većinu regulira HIF sustav. Genska analiza i klasifikacija tumora u odnosu na odgovor na hipoksiju razvrstala je SSKBS u grupu tumora s visokim odgovorom na hipoksiju, odnosno stabilizacijom HIF-1 $\alpha$  uz prekomjernu regulaciju gena odgovornih za taj odgovor uključujući VEGF. Drugi tumori bubrega su imali nizak odgovor na hipoksiju. Isto tako ispitivanje unutar grupe karcinoma dojke tumori s visokim odgovorom na hipoksiju imali su niži postotak preživljenja. (160). Prekomjerna ukupna ekspresija HIF-1 $\alpha$  u tumorima u našem radu bila je asocirana s lošijom prognozom SSKBS, upravo kao i ispitivani angiogeni čimbenici. I nuklearna i citoplazmatska ekspresija je bila statistički važna u usporedbi s angiogenim čimbenicima te kliničkopatološkim parametrima. Nuklearna HIF-1 $\alpha$  ekspresija je bila značajno inverzno povezana u usporedbi s difuznim VEGF-A imunoobojenjem dok je citoplazmatska ekspresija HIF-1 $\alpha$  pokazivala upravo proporcionalnu povezanost sa difuznim VEGF-A i VEGF-C citoplazmatskim imunoizražajem. To bi značilo da nuklearna odnosno citoplazmatka ekspresija HIF-1 $\alpha$  odražava funkcionalnu dinamiku HIF-a kao transkripcijskog faktora u odnosu na ekspresiju VEGF-a. Usporedba HIF-1 $\alpha$  s



kliničkopatološkim parametrima pokazuje da je citoplazmatska ekspresija bila povezana sa lošijim prognostičkim čimbenicima i puno kraćim preživljenjem pacijenata sa SSKBS kada je ta ispoljenost bila izrazito visoka. Viši postotak HIF-1 $\alpha$  lokaliziranog u jezgri povezan je sa duljim preživljenjem. Recentni literaturni podaci o ekspresiji ovog faktora transkripcije još su uvijek kontroverzni. Prema Kubis-u i autorima pojačana ekspresija angiogenih gena nastaje zbog povećanja HIF-1 $\alpha$  u citoplazmi zbog inhibicije njezine degradacije, a ne zbog regulacije nuklearnog importa pomoću nuklearnog lokacijskog signala. (161,162). Nasuprot tome subcelularna lokalizacija i dinamičko premještanje transkripcijskih faktora u studiji Amazita i autora pokazano je kao jedno od glavnih mehanizama regulacije transkripcijske aktivnosti. Kinetika nuklearnog prijenosa u citoplazmu može utjecati na njihovu degradaciju, a prometovanje između jezgre i citoplazme može omogućiti neke funkcionalne interakcije sa citoplazmatskim partnerima (163). U našem slučaju moguće je da se akumulirani citoplazmatski HIF-a može upustiti u funkcionalnu interakciju s citoplazmatskim VEGF, povrh dobro dokumentirane uloge HIF-a u transkripciji VEGF-a, kada je HIF1 $\alpha$  zajedno sa HIF 1  $\beta$  lociran u jezgri. Jubb i koautori su uspoređujući VEGF u različitim tumorima s ekspresijom HIF-1 $\alpha$  promatrali samo nuklearnu ekspresiju i ustanovili da postoji relativno jaka povezanost između dva čimbenika u SSKBS objašnjavajući nalaz poznatom činjenicom reducirane HIF-1 $\alpha$  degradacije u ovim tumorima zbog nedostatka pVHL funkcije. Sličan nalaz našli su u karcinomima pluća, seroznim adenokarcinomima ovarija, liposarkomima, i medularnim karcinomima štitnjače (164). Klatte i autori su u svojoj studiji zaključili da visoka nuklearna ekspresija značajno korelira sa markerima apoptoze, VEGF ekspresijom i lošijim preživljenjem u odnosu na pacijente sa niskom nuklearnom ekspresijom HIF-1 $\alpha$  što se zadržalo i u multivarijantnoj analizi (159). Slični rezultati su objavljeni u studiji Shintani-a i suradnika za tumore mekih tkiva (165). Lindgren i suradnici nisu evaluirali

nuklearno obojenje te su našli da je u pacijenata s SSKBS citoplazmatska HIF-1 $\alpha$  ekspresija značajno niža u agresivnim tumorima nego u tumorima ograničenim samo na bubreg. (166). Di Christophano je zapazio da u VHL inaktiviranim tumorima jaka citoplazmatska ekspresija HIF-1 $\alpha$  znači bolju prognozu, dok je izrazita nuklearna ekspresija ovog čimbenika povezana sa gorim tumor specifičnim preživljenjem.(158). Naši su rezultati oprečni rezultatima spomenutih istraživanja.

Diskrepanca između studija može reflektirati dinamiku ravnoteže različitog rasporeda HIF-1 $\alpha$  u stanici i trenutne funkcije ovog spoja unutar višestrukog djelovanja HIF sustava. Rezultati našeg istraživanja izdvajaju agresivniji subtip SSKBS koji prekomjerno eksprimira VEGF-A i HIF-1 $\alpha$  u citoplazmi što može imati kliničke implikacije i predložiti HIF-1 $\alpha$  biomarkerom progresije tumora i ciljem za terapiju. Značaj asocijacije prekomjerne ekspresije HIF-1 $\alpha$  u jezgri sa bolje diferenciranim tumorima treba još istražiti.

Inicijalni radovi Mukhopadachway-a sugeriraju da je u signalnom putu i regulaciji VEGF-A važan p53, protein tumor supresorskog gena koji, kad je prekomjerno eksprimiran značajno inhibira transkripciju VEGF-A. p53 postaje aktivan kao odgovor na DNA oštećenje, oksidativni stres, osmotski šok, depleciju ribonukleotida ili onkogenu ekspresiju. U različitim tipovima tumora otkriven je mutirani p53 po tipu recesivnog gubitka funkcije koji ne sprječava oštećenu stanicu u nekontroliranom dijeljenju pa nastaju tumori. Ovakav p53 ne inducira proizvodnju MDM2 proteina u negativnoj povratnoj sprezi pa dolazi do akumulacije p53 proteina u visokim koncentracijama bez funkcionalnog efekta. Gubitak funkcije p53 može izazvati povišenje nivoa HIF-1 $\alpha$  ekspresije u uvjetima hipoksije, što opet, pobuđuje transkripcijsku aktivnost VEGF gena i proizvodnju VEGF proteina sa posljedičnom indukcijom vaskularizacije unutar tumorigeneze (60). Studije pokazuju da je prekomjerna ekspresija u KBS česta i da se

javlja u oko 36% slučajeva (Haiteli sur.) na 97 SKB , a u većim serijama oko 29.5% na 246 tumora (Zigeuner i sur) bez obzira na tip KBS (167). U studiji Zigeuner-a koja ispituje ekspresiju p53 u različitim subtipovima KBS postotak p53 pozitivnih slučajeva unutar SSKBS grupe je bio 11.9%, što je bilo značajno manje od postotka u papilarnih (70.0%) odnosno kromofobnih (27.3%) KBS (168). Rezultati naše studije uzimali su u obzir vrijednost medijana odnosno srednje vrijednosti postotka stanica koje su pokazivale nuklearni pozitivitet na p53, kao granicu prekomjerne ekspresije. Prekomjerna ekspresija je bila značajno povezana sa višim stadijem te tumorima većim od 7 cm dok sa preživljenjem p 53 prekomjerna ekspresija nije bila u korelaciji. U spomenutoj studiji Zigeunera, p53 se je u multivarijantnoj analizi jedino u grupi SSKBS zajedno sa gradusom tumora i stadijem bolesti te periodom preživljenja bez metastaza svrstao u neovisne prognostičke parametre predviđajući lošiji ishod bolesti (168). Studija iranskih autora Kabiri i suradnika u grupi od 125 KBS različite histologije nije našla povezanosti p53 prekomjerne ekspresije sa relevantnim kliničkopatološkim prognostičkim čimbenicima, a granica prekomjerne ekspresije p53 u tumorima je bila 5% pozitivnih stanica (169). Vrlo je vjerojatno da su mehanizam prekomjerne ekspresije p53 i njegovog djelovanja drukčiji u KBS, a napose u SSKBS, nego u drugim tipovima karcinoma.

Naši rezultati nisu dokazali višu ekspresiju VEGF-A u usporedbi s p53, a ni inače statistički značajna podjela na perimembranozno i difuzno citoplazmatsko imunoobojenje VEGF-a u tumorima nije dala značajniju povezanost između p53 i ovih skupina tumora. Nasuprot tome veći postotak p53 pozitivnih stanica bio je značajno povezan sa većim postotkom VEGF-C pozitivnih stanica u tumorima. Značajnu inverznu povezanost smo našli kod nuklearnog izražaja HIF-1 $\alpha$  izraženog kroz histoskor koji je bio niži kod većeg postotka p53 pozitivnih stanica u tumorima. Citoplazmatska HIF-1 $\alpha$  ekspresija u stanicama, opet izražena kao histoskor, bila je značajno viša kod višeg postotka pozitivnih

p53 stanica u ispitivanim SSKBS. Ova povezanost p53 i HIF-1 $\alpha$  potkrepljena je nalazima iz literature. Naime HIF-1 $\alpha$  je konstitutivno prisutna u citoplazmi te se brzo degradira pomoću ubikvitin proteasomnog puta sa poluživotom kraćim od samo 5 minuta.. Danas se zna da postoji dualna funkcija HIF-1 $\alpha$  ovisna o statusu fosforilacije. U fosforiliranom stanju HIF-1 $\alpha$  se veže na nuklearni translokator HIF-1 $\beta$  prebacuje u jezgru i potiče transkripciju gena odgovornih za suočavanje stanice sa hipoksijom. S druge strane u uvjetima teške i prolongirane hipoksije dolazi do stvaranja defosforilirane HIF-1 $\alpha$  te povezivanja s p53 molekulom. Nastankom ternarnog kompleksa s MDM2 molekulom, koja inače sudjeluje u normalnoj degradaciji p53, dolazi do indukcije samog p53 proteina. Inducirani p53 može izazvati apoptozu hipoksijom oštećene stanice. Tako defosforilirana forma HIF-1 $\alpha$  kroz stabilizaciju p53 u jezgri može posredovati apoptozu hipoksične stanice. U tumorima, hipoksija je gotovo fiziološki fenomen i time je smanjen potencijal za nastanak defosforililarane HIF-1 $\alpha$  što može predstavljati novi mehanizam za razvoj solidnih tumora kroz povećanje fosforilirane HIF-1 $\alpha$  (80) .

Studije se razilaze u nalazima funkcionalnosti p53 u karcinomima bubrežnih stanica. Dok Gurova i suradnici nalaze visoku ekspresiju divljeg tipa p53 koji je inaktivan (170), studije Warburton-a i suradnika pokazuju da je ovaj protein funkcionalan u tumorima s dokazanim divljim tipom p53 najviše zahvaljujući MDM2 regulacijskoj molekuli (167).

Jasno je da p53 utječe na progresiju KBS i da je marker lošije prognoze ali mehanizmi njegovog djelovanja nisu još razjašnjeni u ovom tipu karcinoma. S obzirom na studije koje ga povezuju s HIF-1 $\alpha$  moguće je da odgovor treba tražiti u njihovoj interakciji a naši rezultati glede subcelularne lokalizacije HIF-1 $\alpha$  mogli bi biti od koristi.

U ekspresiji VEGF-a sudjeluju i čimbenici rasta preko svojih receptora koji za djelovanje koriste protein kinaza kaskadu preko aktivacije RAS puta odnosno mitogen aktivirajućih kinaza i PI3 puta kroz mTOR . Preklapajući se u ovoj aktivaciji protein kinaza s VEGF –

A, EGF i PDGF preko svojih receptora i HIF sustava mogu sudjelovati u prekomjernoj ekspresiji ovog angiogenog čimbenika, a sam VEGF djelovati autokrino na tumorsku stanicu (109).

Mnoge studije navode prekomjernu ekspresiju EGFR u KBS koji se intenzivno proučava kao cilj za terapijsko djelovanje. EGFR je član receptor HER/Erb-B familije tirozin kinaza receptora koje potiču proliferaciju, diferencijaciju, tumorski rast, inhibiciju apoptoze, migraciju, angiogenezu i preživljenje tumorskih stanica. Ovi uticaji na progresiju tumora ostvaruju se preko pojačane produkcije EGF ili liganada za EGFR koji potiču od tumorskih stanica ili strome, visoke ekspresije samog receptora na membrani stanica kroz amplifikaciju ili mutaciju gena ekstracelularne domene odnosno interne aktivacijske petlje. U KBS nisu otkrivene mutacije interne tirozin kinaza domene, a amplifikacija gena se rijetko viđa. Visoka ekspresija EGFR u tumorima glave i vrata, dojke, pluća i mokraćnog mjehura povezana je s lošijom prognozom. Studije koje istražuju EGFR u KBS pokazuju kontroverzne rezultate. Većina njih povezuje visoku ekspresiju EGFR s lošijim prognostičkim parametrima dok manjina pokazuje suprotne rezultate ili ne potvrđuje značajniju prognostičku važnost (75). Prema nekim studijama 50-90 % KBS eksprimira EGFR (171) što se slaže s našim rezultatima (92,3%). U našem istraživanju srednja vrijednost postotka pozitivnih stanica bila je 3,40 % ( $\pm 33,92$ ), a ukupni HS 56,54( $\pm 62,23$ ), dok je u radu Kallio i suradnika (172) srednja vrijednost HS određivana istom metodom u SSKBS bila nešto veća i iznosila 79 ( $\pm 69$ ). Još veća ekspresija EGFR izražena kao HS bila je u papilarnim karcinomima (140 $\pm$ 63). U odnosu na kliničko patološke parametre EGFR se u univariatnoj analizi prikazan kao ukupni HS pokazao prognostički značajnim parametrom u visokoj korelaciji sa NG i veličinom tumora kao i sa tumorskim stadijem dok sa proliferacijskim indeksom izraženim kao postotak Ki67 pozitivnih stanica EGFR HS nije bio značajno povezan. Kada smo uzimali

u obzir samo kontinuiranu membransku ekspresiju EGFR prikazanu kao HS značajnu povezanost smo dobili s NG i veličinom tumora to jest veća ekspresija je bila povezana sa višim NG i većim tumorima. Spomenuta analiza Kallio-a dobila je obrnute rezultate u odnosu EGFR i nuklearnog gradusa dok sa stadijem bolesti nije bilo povezanosti. U odnosu na preživljenje grupa tumora s predominantno kontinuiranim izražajem EGFR bila je asocirana s dobrom prognozom. Rezultati naše studije se slažu sa studijama Uhlman-a i suradnika koji su usporedbom membranozne ekspresije EGFR i preživljenja također dobili signifikantno lošije preživljenje kod jačeg membranskog izražaja.(173). Moch i suradnici su našli da je prekomjerna ekspresija ovog receptora čest nalaz u KBS te je povezana sa proliferacijom tumorskih stanica (174). Langner i suradnici se u svojoj studiji pitaju da li su heterogeni rezultati glede prognostičkog značenja EGFR imunohistokemijskog nalaza u KBS povezani sa različitim kriterijima za evaluaciju imunohistokemijskog obojenja (175). Ova grupa istraživača uzimala je u obzir i citoplazmatsko obojenje povezujući citoplazmatsku ekspresiju s lošijom prognozom dok mi citoplazmatsku ekspresiju nismo uzimalo u obzir u statističkom izračunu. jer je nađena u 3,13% tumora i to vrlo heterogeno, uglavom slabo izraženo u postotku stanica pretežno od 2 % do 10%. Nadalje su ovi autori jaču ekspresiju membranskog obojenje povezali s lošijom prognozom što su prikazali i naši rezultati. S obzirom na ovaj pregled različitih rezultata nameće se zaključak da doista treba standardizirati evaluaciju EGFR u tumorima ako želimo ovaj protein upotrijebiti kao biomarker. S obzirom na važnost EGFR u razvoju i progresiji tumora analizirali smo metodom fluorescentne in situ hibridizacije moguće promjene na genskom nivou za EGFR1 u tumorskim stanicama. Proba je dizajnirana za utvrđivanje i kvantificiranje broja kopija EGFR gena lociranog na 7p12. Uočili smo da kod tumora koji slabo ili umjereno eksprimiraju EGFR ne nalazimo osobitih promjena u broju kopija gena, a niti kod izrazite ekspresije nismo našli amplifikaciju. Nasuprot tome

u grupi tumora koji su pokazivali jaku i pretežno kontinuiranu membransku ekspresiju našli smo polisomiju kromosoma 7. Isti rezultat možemo pročitati u članku Moch-a i koautora koji također nisu našli amplifikaciju gena, a polisomija kromosoma 7 iako češća u SSKBS nego u drugim tipovima KBS (81%) nije bila povezana sa ekspresijom EGFR proteina. Ova grupa autora zaključuje da ni broj kopija gena, niti veći broj kromosoma 7 nisu mehanizam koji bi odražavao prekomjernu ekspresiju ovog proteina. (174). Naši rezultati ipak govore u prilog tome da količina gena izražena kroz povećan broj kopija ipak može biti izvorom prekomjerne ekspresije EGFR na proteinskom nivou.

U kontekstu KBS, interakcija EGFR i angiogeneze može biti važna za progresiju tumora. Eksperimentalne studije su pokazale da u prisustvu VEGF epidermalni čimbenik rasta inducira formaciju endotelnih tuba i olakšava migraciju endotelnih stanica u staničnim kulturama, a aktivacija EGFR puta potiče produkciju VEGF-a i čimbenika rasta fibroblasta. (75). U stanjima ograničenog stvaranja VEGF, EGFR preuzima važnu ulogu proliferacije, preživljenja i nastanka novih izdanaka krvnih žila. Blokada EGFR signalnog puta pak dovodi do smanjenja ekspresije VEGF-a, a oba puta su povezana kroz Np1 (neuropilin receptor). (176). Parikh i suradnici su također potvrdili na staničnim linijama te humanom karcinomu gušterače da VEGF i EGFR signalni putevi mogu preko Np1 (koreceptora koji pojačava ekspresiju i senzitivnost receptora za VEGF-A) biti međusobno povezani, a ekspresija VEGF-A modulirana djelovanjem epidermalnog čimbenika rasta i njegovog receptora što se može iskoristiti u kombiniranoj ciljnoj terapiji (177). U našoj analizi našli smo statistički značajnu povezanost između ekspresije VEGF-A i VEGF-C.

Sve varijable kroz koje smo ispitivali EGFR imunoekspresiju, ukupni postotak pozitivnih stanica, ukupni histoskor i histoskor kontinuiranog obojenja membrane bile su upravo proporcionalno značajno povezane s difuznom citoplazmatskom ekspresijom VEGF-A i

VEGF-C, dok su ukupni histoskor te HS kontinuiranog EGFR obojenja bili obrnuto proporcionalno povezani s perimembranskim citoplazmatskim VEGF-A i VEGF-C imunoizražajem. U literaturi nema podataka o utjecaju EGFR na lokalizaciju VEGF-a u citoplazmi ali ako se prisjetimo prije navedenih rezultata koji povezuju perimembranoznu ekspresiju VEGF-A i C sa bolje diferenciranim tumorima i duljim preživljenjem ovi dobiveni statistički podatci niže ekspresije EGFR postaju logični. Isto vrijedi i za difuznu VEGF-A i C ekspresiju koja karakterizira agresivnije tumore s jačom ekspresijom EGFR. Time se i naši rezultati uvrštavaju u brojna istraživanja koja u zadnje dvije dekade potvrđuju važnost oba signalna puta za progresiju SSKBS te izdvajaju dvije klase inhibitora koji u sprečavanju progresije ovog tumora daju bolje rezultate kod simultane primjene ciljnih lijekova. Ovakva povezanost VEGF-C indirektno ukazuje da su signalni putevi ovog angiogenog čimbenika regulirani slično kao i za VEGF-A. Gubitak funkcije VHL supresor gena, koje je izraženo u SSKBS, asocirano je s disregulacijom HIF-1 $\alpha$  transkripcijskog faktora za angiogene faktore uključujući VEGF, te preko transformirajućeg faktora rasta i sam EGFR kao njegov receptor. Za inhibiciju ovog receptora i njegovog puta potrebno je blokirati uz RAS i PI3K put koji preko sustava HIF-a dovodi do stimulacije parakrine petlje zbog pojačane produkcije liganada, napose TGF  $\alpha$ . Različiti ligandi za EGFR induciraju različitu ekspresiju i prema tome i reguliraju funkciju ovog receptora. Studije su otkrile su TGF  $\alpha$  omogućava recikliranje samog receptora što omogućava i snažnije mitogeno djelovanje TGF  $\alpha$ . (178). Tako se danas uviđa da je SSKBS senzitivna na dualnu terapiju koja inhibira i EGFR i VEGF signalni put, a u sklopu ove terapije predlaže se direktna blokada HIF faktora umjesto lijekova koji blokiraju same faktore rasta (179). Ponovo se promovira HIF-1 $\alpha$  kao ključni događaj u razvoju i progresiji SSKBS. U odnosu na EGFR u našoj studiji HIF-1 $\alpha$  ne korelira što bi značilo da kod prekomjerne ekspresije HIF-1 $\alpha$  u povratnoj sprezi nismo dobili značajnu



indukciju EGFR. Slične rezultate smo dobili u korelaciji EGFR s p53 proteinom. Danas se zna da u sustavu reakcije na hipoksiju u tumorima sudjeluje niz spojeva a jedan od njih je i transmembranski enzim karbonska anhidraza 9 (CA9). Spominje se u korelaciji sa angiogenezaom i ekspresijom angiogenih čimbenika te aktivacijom drugih molekularnih puteva kao što su EGFR, bcl2, p53 a Wykoff i suradnici su pokazali da odvojeno od konstitutivne ekspresije u nekim tumorima može biti induciran hipoksijom odnosno preko HIF sustava (180). Ovaj enzim je naročito pozitivan u hipoksičnim područjima oko nekroze što smo primijetili i za VEGF-A ekspresiju (181), te u pozitivnoj kontroli za HIF-1 $\alpha$  ekspresiju u glioblastomima. Giatromanolaki-eva i suradnici predlažu da je različit intenzitet hipoksije potreban za indukciju proteina induciranih HIF sustavom. Blaga hipoksija može biti dostatna za indukciju VEGF-a koji može prevenirati nekrozu. Nedostatna VEGF-om posredovana angiogeneza u tumorima zbog prisutnosti endogenih inhibitora angiogeneze, iregularna perfuzija tumorskog tkiva nepravilnim novostvorenim krvnim žilama ili pojačana potrošnja kisika od strane proliferirajućih tumorskih stanica, dovodi do fokalno izražene jače hipoksije sa indukcijom CA9 pojačane ekspresije, te niza drugih angiogenih faktora. Dolazi do prelaska na glikolitički put metabolizma, posljedične acidifikacije ekstracelularnog matriksa koja prati hipoksično/nekrotični događaj te inducira ekspresiju angiogenih faktora i neovaskularizaciju. Značajna povezanost CA9 u agresivnijim tumorima nađena je sa pojačanom regulacijom EGFR te invazijom, migracijom i metastatskom rasapom tumora (182).

Uzimajući u obzir navedeno možemo reći da VEGF u SSKBS doista može služiti kao biomarker prognoze i terapije:

Naši rezultati izdvajaju dvije grupe tumora koje se razlikuju u ekspresiji VEGF-A i ekspresiji njegovih regulatornih čimbenika.

S jedne strane se nalazi grupa tumora niskog nuklearnog gradusa (NG 1,2), optički prazne, svijetle citoplazme, izražene vaskularizacije koja nalikuje na peritubularnu vaskularnu mrežu, s perimembranoznom ekspresijom VEGF-A i VEGF-C, povišene ekspresije nuklearnog izražaja HIF-1 $\alpha$ , niže ekspresije p53 tumor supresorskog proteina te niže ekspresije EGFR. Ova grupa tumora povezana je s boljim petogodišnjim preživljenjem

S druge strane su tumori višeg nuklearnog gradusa (3,4), nepravilnijih staničnih membrana, fokalno eozinofilne citoplazme s oskudnom i nepravilnom vaskularizacijom, sa stvaranjem većih vaskularnih kanala, nekrozom i krvarenjem koji imaju povišenu, difuznu, citoplazmatsku ekspresiju VEGF-A i C, citoplazmatsku ekspresiju HIF-1 $\alpha$ , povišenu ekspresiju p53 te EGFR histoskora uz statistički dokazanu povezanost spomenutih parametra s lošijim preživljenjem pacijenata. U odnosu na sve ispitivane parametre u multivarijantnoj analizi nuklearni gradus je glede prognoze zadržao status neovisnog prognostičkog parametra.

Na temelju ovih rezultata može se pretpostaviti da su u prvoj skupini tumora u uvjetima niže dozirane hipoksije još uvijek prisutni mehanizmi koji odražavaju normalnu reakciju na hipoksiju sa pojačanom produkcijom VEGF-a te održanom degradacijom proteina i izmjenom lokalizacije iz citoplazme u jezgru i obratno.

U drugoj pak skupini tumora dolazi do poremećene funkcije ovih sustava sa posljedičnom pojačanom ekspresijom angiogenih citokina i njihovog transkripcijskog faktora u citoplazmi, kroz aktivaciju parakrine i autokrine petlje uz sudjelovanje čimbenika rasta i njihovih receptora u progresiji tumora i nastanku metastatske bolesti.

S ove perspektive akumulacije nekih od proteina u citoplazmi, a posebno HIF sustava, možemo razmotriti ponovo staru klasifikaciju tumora bubrega Thoenesa i suradnika iz 1986 godine koja se najviše temelji na citološkim karakteristikama tumora i koja jačanje

eozinofilije u inače predominantno svijetlostaničnom tipu tumora smatra izrazom dediferencijacije (183). Morfološko molekularna korelacija važna je za implementaciju novih biomarkera. Kluger i suradnici pokušali su su razraditi klasifikaciju KBS baziranu na ekspresiji VEGF i VEGF receptora u tumorskim i endotelnim stanicama u cilju određivanja grupa za terapiju antiangiogenim čimbenicima. Našli su da bi grupa s nižom ekspresijom VEGF receptora na tumorskim stanicama te pojačanom vaskularizacijom bila pogodna za terapiju anti VEGF ciljnim lijekovima kao što je bevacizumab. (125).

Analogno tome naši rezultati dijele tumore na nivou citoplazmatske ekspresije VEGF-a i HIF-1 $\alpha$  te mebranskom imunoobojeњу EGFR. Prema našim opažanjima, grupa tumora nižeg nuklearnog gradusa sa perimembranskim imunoizražajem VEGF u citoplazmi tumorskih stanica hipotetski bi reagirala na samu anti VEGF ciljnu terapiju. Grupa tumora višeg nuklearnog gradusa, pojačane citoplazmatske eozinofilije s difuznom citoplazmatskom ekspresijom VEGF i citoplazmatskom HIF-1 $\alpha$  te povišenom ekspresijom EGFR zahtijevala bi dualnu terapiju ne samo blokatora VEGF-a nego i blokatora liganada EGFR ili tirozin kinaza signalnog puta.

## **6. ZAKLJUČCI**

### **I. Ekspresija VEGF-A na standardnim tkivnim rezovima i tkivnim mikroarejima svijetlo staničnog karcinoma bubrežnih stanica (SSKBS):**

1. Ekspresija VEGF-A u normalnom tkivu bubrega je homogena i ograničena na citoplazmu tubularnog epitela, glatko mišićne stanice i makrofage u intersticiju te mezangij u glomerulima, dok je u SSKBS uglavnom heterogena i jače izražena na periferiji tumora.
2. Izrazito visoka ukupna ekspresija VEGF-A u SSKBS inverzno je povezana sa srednjom gustoćom krvnih žila, a značajno je udružena s lošijim prognostičkim faktorima i to višim nuklearnim gradusom, većim tumorima i višim indeksom proliferacije, međutim nije povezana sa preživljenjem bolesnika.
3. Citoplazmatska ekspresija VEGF-A u tumorima koja se prikazuje kao perimembranozna (pVEGF-A) ili difuzna (d VEGF-A), nije statistički udružena sa srednjom gustoćom krvnih žila, iako se u tumorima s difuznom citoplazmatskom ekspresijom i višim nuklearnim gradusom opažaju nepravilniji (patološki) vaskularni prostori. dVEGF-A korelira s nuklearnim gradusom, velikim tumorima, patološkim stadijem i značajno kraćim preživljenjem, a pVEGF-A s dužim preživljenjem bolesnika.
4. U multivarijantnoj analizi s preživljenjem podijeljenim u tri kategorije (najduže srednje i najkraće) podjela na perimembranozno i difuzno citoplazmatsko imunoobojenje VEGF-

A u odnosu na nuklearni gradus i stadij bolesti pokazuje status neovisnog prognostičkog parametra.

## **II. Ekspresija VEGF-C, HIF-1 $\alpha$ , p53 i EGFR na rezovima tkivnih mikroareja SSKBS**

1. Citoplazmatska ekspresija VEGF-C u tumorima prikazuje se kao perimembranozna (p VEGF-C) ili difuzna (d VEGF-C). Tumori s dVEGF-C ekspresijom povezani su s lošijom prognozom tj. višim nuklearnim gradusom, većim tumorima, višim stadijem bolesti te značajno kraćim preživljenjem, dok je pVEGF-C ekspresija udružena s dužim preživljenjem.

Ukupna VEGF-C ekspresija nije povezana s kliničkopatološkim parametrima kao ni s preživljenjem bolesnika.

2. Ekspresija HIF-1 $\alpha$  u SSKBS prikazuje se kao citoplazmatska (cHIF-1 $\alpha$ ) i nuklearna (n HIF-1 $\alpha$ ). Jača cHIF-1 $\alpha$  ekspresija udružena je s lošijim prognostičkim čimbenicima i puno kraćim preživljenjem, a jača nHIF-1 $\alpha$  ekspresija s duljim preživljenjem bolesnika sa SSKBS.

3. Viši postotak p53, tumor supresorskog proteina u SSKBS, povezan je s višim stadijem bolesti te tumorima većim od 7 cm, ali ne utječe značajno na preživljenje bolesnika.

4. Ekspresija EGFR ima prognostičko značenje obzirom da viša ekspresija korelira s višim nuklearnim gradusom i višim stadijem bolesti, a kontinuirano membransko obojenje jačeg intenziteta značajno je povezano i s kraćim preživljenjem bolesnika sa SSKBS.

5. Tumori s izrazitom ekspresijom EGFR jačeg intenziteta pokazuju polisomiju gena 7 te količina gena izražena kroz povećan broj kopija kromosoma može biti izvorom prekomjerne ekspresije EGFR na proteinskom nivou.

6. Unutar analiziranih parametara u multivarijantnoj analizi jedino se citoplazmatska ekspresija HIF-1 $\alpha$  ističe kao neovisan prognostički čimbenik.

### **III. Ekspresija VEGF-A u odnosu na ispitane čimbenike:**

1. Difuzna citoplazmatska ekspresija VEGF-A značajno je proporcionalno povezana s difuznom citoplazmatskom ekspresijom VEGF-C, citoplazmatskom ekspresijom HIF-1 $\alpha$ , višom p53 nuklearnom ekspresijom i višom EGFR membranskom ekspresijom.

2. Perimembranozna citoplazmatska ekspresija VEGF-A nije statistički značajno udružena s ekspresijom VEGF-C i p53, ali je obrnuto proporcionalno povezana sa citoplazmatskom ekspresijom HIF-1 $\alpha$  i EGFR membranskom ekspresijom.

3. Jača citoplazmatska ekspresija angiogenih faktora (VEGF-A i VEGF-C) udružena s pojačanom ekspresijom p53 i EGFR, manjim brojem krvnih žila te kliničko patološko nepovoljnijim prognostičkim karakteristikama ukazuje na SSKBS slabije aktivnosti hipoksičnog faktora s obzirom na slabiji nuklearni izražaj HIF-1 $\alpha$  u ovih karcinoma..

## **7. LITERATURA**

1. Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *Journal of Internal Medicine* 2004; 255: 538-561
2. Eichmann A, Pardanaud L, Li Yuan, Delphine M. Vasculogenesis and the Search for the Haemangioblast. *Journal of Haematotherapy & Stem Cell Research*, 2002;11(2): 207-214
3. Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsusita K, Nakashima M. A novel Stem Cell Source for Vasculogenesis in ischaemia: Subfraction of Side Population Cells from Dental Pulp. *Stem Cells*. 2008; Epub ahead of print
4. Murohara T, Therapeutic vasculogenesis using human cord blood-derived endothelial progenitors, *Trends Cardiovasc Med*. 2001;11:303-307
5. Carmeliet P. Developmental biology: One cell, two fates. *Nature* 2000; 408: 43-45
6. Yamashita J, Itoh H, Hirasima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Flk1 positive cells derived from embryonic stem cells serve as a vascular progenitors. *Nature* 2000; 408: 92-96
7. Loffredo F, Lee R. T, Therapeutic Vasculogenesis It Takes Two, *Circ. Res*. 2008;103:128-130
8. Gerharth H, Betsholtz C, Endothelial-pericyte interaction in angiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003; 314: 15-23
9. Melero-Martin JM, De Obaldia ME, Kang S, Khan ZA, Yuan L, Oettgen P, Bischoff J. Engineering robust and functional vascular networks in vivo with human adult and cord-blood derived progenitor cells. *Circ. Res*. 2008;103:194-202
10. Rakesh K Jain. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine*. 2003; 9 (6): 685-693
11. Boardman K.C, Swartz M.A. Interstitial flow as a guide for lymphangiogenesis, *Circ. Res*. 2003; 92:801-808.

12. van Hinsberg V. W.M, Engelse M.A, Quax P.H.A. Pericellular Proteases in Angiogenesis and Vasculogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* 2006;26:716-728
13. Stratman A.N, Koh W, Davis M.J, Davis G E. Vascular guidance tunnels direct endothelial cell-pericyte interactions and basement membrane deposition. *The FASEB Journal*, 2008;22:746-12
14. Sund M, Xie L, Kalluri R. The contribution of vascular basement membranes and extracellular matrix to the mechanics of tumour angiogenesis. *APMIS*.2004;112:450-462
15. Djonov V, Baum O, Burri PH, Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res* (2003);314:107-11
16. Fox S. B, Harris A.L. Histological quantitation of tumour angiogenesis, *APMIS*,2004;112:413-430.
17. Folkman J. Tumor angiogenesis faktor. *Cancer Research*. 1974;34:2109-2113
18. Warren B. A. In vivo and Electron microscopic Study of vessels in a Hemangiopericytoma of the Hamster. *Angiologica* 1974;5:230-249.)
19. Jain R.K. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nature Medicine*, 2001; 9:987-989.
20. Baish J.N, Jain R.K. Fractals and cancer, *Cancer Res*, 2000;60:3683-3688
21. Hashizume H et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness, *Am. J. Pathol.* 2000;156:1363-1380
22. Sivridis E, Giatromanolaki A, M.I Koukourakis M.I, The vascular network of tumours what is not for? *J Pathol* 201 (2003) 173-180.
23. Bergers G. Benjamin E. L . Tumorigenesis and angiogenic switch *Nature Reviews Cancer*.2003;3:401-410
24. Gjini E, Tumor Angiogenesis A review on Established and Innovative Concepts in Antiangiogenic Therapy, Msc Dissertation 2005, Drug innovation Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Utrecht
25. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T and Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction, *Trends in Biochemical sciences* 2003; 9(28):488-494
26. Ferrara N, Gerber HP, Le Couter J, *Nature Medicine* .2003; 9: 669 – 676
27. Gerber H-P, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1998;273:13313-13316.



28. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J. Anat.* 2002;200:581-597.
29. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 1997;100:3131-3139.
30. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 1992;153:557-562
31. Weinstein BM. What guides early embryonic blood vessel formation? *Dev. Dyn.* 1999;215:2-11
32. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hilan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 1996;380:439-442.
33. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, Shima DT. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat. Med.* 1999;5:495-502.)
34. Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A, Fujisawa H, Hermans B, Shani M, Jansen S, Hicklin D, Anderson DJ, Gardiner T, Hammes HP, Moons L, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P, D'Amore PA. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J. clin. Invest.* 2002;109:327- 336.
35. Bates DO, Cui TG, Doughty JM *et al.*: VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 62: 4123-31, 2002.
36. Lei J, Jiang A and Pei D: Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183. *Biochim Biophys Acta.* 1998, 1443: 400-6,
37. Soker S, Takashima S, Miao HK, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumors cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735-745

38. MiaoHQ, Klagsbrun M. Neuropilin is a mediator of angiogenesis. *Cancer Metastat Rev.* 2000;19:29-37
39. Jacobsen J, Vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma., Departments of Surgical and Perioperative Sciences, Urology and Andrology, Medical Biosciences, Clinical Chemistry; Radiation Sciences, Oncology, and Medical Biosciences, Pathology, Umeå University Medical Dissertations. New Series No. 1006 ISSN 0346-6612 ISBN 91-7264-029-4.)
40. Maharaj A S.R, Saint-Geniez M, Maldonado A E, D'Amore P A. Vascular Endothelial Growth Factor Localization in the Adult. *American Journal of Pathology.* 2006;(168)2:639-648.
41. Marti HH, Risau W, Systemic hypoxia changes in organ specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:15809-15814
42. Oliver J, Al-Awgati Q. Development of vascular elements during renal organogenesis, *Kidney International.* 2000;57:2167-2168
43. Sariola H, Ekblom P, Lehtonen E, Saxen L. Differentiation and vascularization of the metanephric kidney grafted on chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1983;96:427-435
44. Oliver JA, Goldberg M, Al-Awgati Q. Endothelial cell targeting during renal development: use of monoclonal antibodies. *Am. J Physiol* 1997;272:153-159.)
45. Robert B, John St PL, Abrahamson DR, Direct vascular visualisation of renal vascular morphogenesis in Flk1 heterozygous mutant mice. *Am J Physiol* 1998;275:164-172
46. Del Porto F, Mariotti A, Ilardi M, Messina F.R, Afeltra A, Amoroso A, *Eu Rev Med and Pharmacol Sci.* 1999;3:149-153.
47. Kamba T, Tam B Y. Y, Hashizume H, Haskell A, Sennino B, Mancuso M. R, Norberg Scott M, O'Brien S. M, Davis R. B, Gowen L.C, Anderson K D, Thurston G, Joho S, Springer M.L, Kuo C.J, McDonald D. M. VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: 560-576)
48. Del Porto F, Mariotti A, Ilardi M, Messina F.R, Afeltra A, Amoroso A. Kidney vasculogenesis and angiogenesis: role of Vascular Endothelial Growth Factor. *Eu Re Med Pharmacol Sci.* 1993; 3:149-153

49. Wakelin SJ, Marson L, Howie S, EM, Garden J, Lamb R. J, Forsythe J L.R. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Kidney in Health and Disease. *Nephron Physiol*, 2004; 98:73-79.
50. Patard J-J. Prognostic and Biological Significance of Lymph Node Spreading in Renal Cell Carcinoma. *European Urology*. 2006;49:220-222.
51. Patard J-J. ,Leclercque N, Fergelot P, Understanding the importance of smart drugs in renal cell carcinoma, *European Urology* , 2006;49(4):633-643
52. Nilsson I, Shibuya M, Wenstrom S. Differential activation of vascular genes by hypoxia in primary endothelial cells. *Exp.Cell Res*.2004;299(2):476-85)
53. Kukkk E, Lymboussaki A, Taira S, Kaipainen A, Jeltsch M, Joukov V, Alitalo K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development*. 1996;122:3829-3837.
54. Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K. Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*. 1997;276:1423-1425.
55. Witmer A. N, Bliswijk B.C, Dai J, Partanen T.A, Vrensen G.F.J.M, Schlingemann R.O. VEGFR-3 in adult angiogenesis. *J Pathol*. 2001; 195: 490-97
56. Schoppmann F, Fenzl A, Shindl M, Blachleitner-Hofmann T, Nagy K, Gnant M, Horvat R, Jakesz R, Birner P. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  correlates with VEGF-C expression and lymphangiogenesis in breast cancer. 2006; 99:135-141.
57. Jacobsen J, Grankvist K, Rasmunson T, Ljunberg B, Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Renal cell carcinoma. *BJU Int*, 2004;93(3):297-307.
58. Levy AP, Levy NS, Iliopoulos O et al: Regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia and its modulation by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Kidney Int*.1997; 51:575-8,.)
59. Stephen R.M, Gillies R.J, Promise and Progress for Funcional and Molecula Imaging of Response to Targeted Therapies, *Pharmaceutical Research*. 2007; (24) 6: 1172-1185
60. Mukhopadhyay D, Datta K. Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors. *Semin Cancer Biol*. 2004;14:123-30.

61. Lee KA, Roth RA, LaPres JJ. Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007;113:229-246.
62. Harris A. L Hypoxia – a key regulatory factor in tumor growth, *Nature Review Cancer* 2002;2:38-47
63. Hung-Lung Ke, Yu-Ching Wei, Sheau-Fang Yang, Ching-Chia Li, Deng-Chyang Wu, Chun-Hsiung Huang, Wen-Jeng Wu. Clinical Investigation Overexpression of Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  predicts an unfavorable outcome in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *International Journal of Urology*. 2008;15(3):200-2005
64. H.F. Zhang, P. Gao, R. Fukuda, G. Kumar, B. Krishnamachary, K.I. Zeller, C.V. Dang, G.L. Semenza. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell*. 2007;11(5):407-420.
65. Wang W, Zhang J. Induction of renoprotective gene expression by hypoxia-inducible transcription factor-1 $\alpha$  ameliorates renal damage. *Medical Hypotheses*. 2008;70:984-950.
66. Warburg O, On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123(3191):309-314
67. Semenza G. L . Hypoxia, Clonal selection and the Role of HIF-1 in Tumor Progression. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*,2000;35(2):71-103.
68. Ascroft M. Shutting down blood supplies to tumours *Cancer biology-drug discovery*, annual report [www/icr.ac.uk/annual reserch report](http://www/icr.ac.uk/annual%20research%20report)
69. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy . *Nat Rev Cancer* 2003;3(10):721-723.
70. Sporn RB, Roberts AB. Autocrine growth factors and cancer. *Nature*,1985;313:745-747
71. Wells A. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31(6) :637-643.
72. Venook AP. Epidermal growth factor receptor-targeted treatment for advanced colorectal carcinoma.*Cancer*.2005;103:2435-2446
73. Normanno N,De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello M R, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon D. S. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signalling in cancer. *Gene*. 2006;366:2-16.
74. Sini P, Wyder L, Schnell C, O'Reilly, Littlewood, Brandt R, Hynes E. N, Wood J. The tumor and antiangiogenic activity of vascular endothelial growth

- factor receptor inhibition is potentiated by ErbB1 blockade. Clin. Cancer Res. 2005;11(12):4521-32)
75. Ravaud A, Clermont H, Pasticier G, Smith D, Vendrely V, Maire J.P. Epithelial growth factor receptor(EGFR) pathway and renal cell carcinoma. Targ Oncol. 2007;2:99-1059
  76. Read A. P, Strachan T. Chapter 18: Cancer Genetics, Human Molecular genetics 2. 1999. New York: Wiley
  77. Bell S, Klein C, Muller L, Hansen S, Buchner J. p53 contains large unstructured regions in its native state. J. Mol. Biol. 2000;322(5):917-27
  78. Bates S, Philips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Voudsen KH. P14ARF links the tumor suppressor Rb and p53. Nature. 1998;395(6698):124-125.
  79. Ventura A, Kirsh DG, Ventura A, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jack T. Restoration of p53 function leads to tumor regression in vivo. Nature. 2007;445(7128):661-5.
  80. Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T, Dephosphorylated hypoxia-inducible factor1 $\alpha$  as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. Onkogene 2001;20:5779-5788).
  81. Ebbinghaus S.W, Gordon M.S. Renal cell carcinoma: rationale and development of therapeutics inhibitors of angiogenesis. Haematol Oncol Clin N Am. 2004; 18: 1143-59.
  82. Greenlee RT, Murray T, Bolden S., Wingo PA. Cancer statistics 2000. CA Cancer J Clin 2000; 50:7.
  83. Kirkali Z., Tuzel E., Mungan MU. Recent advances in kidney cancer and metastatic disease. BJU Int 2001;88:818-24.
  84. Strnad M. Epidemiology of renal carcinoma in Croatia. Hrvatski zavod za javno zdravstvo 2003;12:14-7.
  85. Đorđević G, Sinožić E, Peitl V, Mustać E. Patologija u urologiji. Medicina 2004; 42(40): 147-152
  86. Chow WH, Devesa SS, Warren JL I sur. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. JAMA 1999;281:1628-31
  87. Parkin DM, Muir CS. Comparability and quality of data. U: Muir C, Waterhouse T, Mack T, ur. Cancer incidence in five continents. New York: UARC Scientific; 1997: 45.

88. Chow WH, Devesa SS, Warren JL, Fraumeni Jr JF. Epidemiology of renal cell carcinoma. U: Vogelzang NJ, Scardino PT, Shipley WU, Coffey DS, ur. Comprehensive textbook of genitourinary oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000:1011-5
89. Dhote R, Pellicercoeur N, Thiounn B, Vidaltrecan D. Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for preventions. BJU Int 2000;86(1):20
90. Wolk A, Gridley G, Niwa S, Lindblad P, McCredie M, Mellemegaard. International renal cell cancer study. Role of diet. Int J Cancer 1996;65:67-73.
91. Yuan JM, Gago-Dominguez M, Castela JE, Hankin JH, Ross RK, Yu MC. Cruciferous vegetables in relation to renal cell carcinoma. Int J Cancer 1998;77:211-6.
92. Sagasawa I, Teresawa Y, Imai K, Sekino H, Takahashi H. Acquired cystic disease of the kidney and renal carcinoma in hemodialysis patients: ultrasonographic evaluation. Br J Urol 1992;70:236-9.
93. Kovacz G. Molecular cytogenetic of renal cell tumors. J. Pathol. 1997;183: 131-133
94. International Union Against Cancer. TNM classification of malignant tumors (6<sup>th</sup> ed). New York: Wiley-Liss; 2003
95. Maher ER, Kaelin JR WG. Von Hippel-Lindau disease. Medicine (Baltimore) 1997;76:381-91.
96. Chauveau D, Duvic C, Chretien Y, Paraf F, Droz D, Melki P I sur. Renal involvement in von Hippel-Lindau disease. Kidney Int 1996;50:944-51.
97. Jacqmin D, Van Poppel H, Kirkali Z, Mickisch G. Renal cancer. Eur Urol 2001;39 (3):1-9.
98. Moch H, Gasser T, Amin MB, Torhorst J, Sauter G, Mihatsch MJ. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma. I Swiss experience of 588 tumors. Cancer 2000;89:604-14.
99. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. Am J Surg Pathol 1982;6:655-63.
100. Van Poppel H, Vandehdriessche H, Boel K, Mertens V, Goethuys H, Hausettermans K I sur. Microscopic vascular invasion is the most relevant

- prognosticator after radical nephrectomy for clinically nonmetastatic renal cell carcinoma. *J Urol* 1997;158:45-9
101. Yasunaga Y, Shin M, Miki T I sur. Prognostic factors of renal cell carcinoma: A multivariate analysis. *J Surg Oncol* 1998;68:11-18.
  102. Delahunt B, Bethwaite PB, Nacey JN I sur. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression as a prognostic indicator for renal cell carcinoma: Comparison for tumor grade, mitotic index and silver staining nucleolar organizer regions numbers. *J Pathol* 1993;170: 471-7.
  103. Rioux-Leclercq N, Turlin B, Bansard JY I sur. Value of immunohistochemical Ki-67 and p53 determinations as predictive factors of outcome in renal cell carcinoma. *Urology* 2000;55:501-5
  104. Ozer E, Yorukoglu K, Gagol O I sur. Prognostic significance of nuclear morphometry in renal cell carcinoma. *BJU Int* 2002;90:20-5.
  105. Vasavada SP, Novick AC, Williams BG. P53, bcl-2 and Bax expression in renal cell carcinoma. *Urology* 1998; 51:1057-67.
  106. Rini B. I, Small E. J. Biology and clinical development of vascular endothelial growth factor –targeted therapy in renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 1028-1043.
  107. Jain RK. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* 2005; 307(5706):58-62.
  108. Vamsidhar Velcheti, Avinash Viswanathan, Ramaswamy Govindan (2006). "The Proportion of Patients with Metastatic Non-small Cell Lung Cancer Potentially Eligible for Treatment with Bevacizumab: A Single Institutional Survey". *Journal of Thoracic Oncology* 2006;1(5): 501
  109. Nelson EC, Evans CP, Lara PN,. Renal cell carcinoma: Current status and emerging therapies. *Cancer Treatment Reviews* 2007;33:299-313.
  110. Lillie RD. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. 3rd ed. New York: McGraw Hill: 1965.
  111. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (eds): «WHO Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs» Lyon: IARC Press, 2004..
  112. Hassan S, Ferrario C, Mamo A, Basik M, Current opinion in Biotechnology. 2008;19(1):19-25.)

113. Cattoretti G, Suurmeijer AJH. Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin embedded tissues using microwaves: a review. *Adv Anatomic Pathol* 1994;2:2-9. )
114. C. Herbst, H. Kosmehl, K.J. Stiller, A. Berndt, M. Eiselt et al., Evaluation of microvessel density by computerised image analysis in human renal cell carcinoma, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 124 (1998) 141–147.
115. N. Weidner, J.P. Semple, W.R. Welch, J. Folkman, Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 324 (1991)1
116. Djordjevic G, Mozetic V, Vrdoljak-Mozetic D, Licul V, Matusan-Ilijas K. Mustac E, Oguic R, Fuckar Z, Jonjic N, Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in clear cell renal cell carcinoma *Path Res Pract* 2007;203:99-106
117. Moch H, Sauter G, Gasser T C, Bubendorf L, Richter J, Presti Jr JC, Waldman FM, Mihatsch MJ. EGF-r gene copy number changes in renal cell carcinoma detected by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Pathology.* 1998;184:424-429
118. Mitsuhika Hanawa, Shioto Suzuki, Yoh Dobashi, Tetsu Yamane, Koji Kono, Nobuyuki Enomoto, Akishi Ooi. EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of oesophagus. *Int. J. Cancer.* 2005;118: 1173-1180
119. Oliviera A.M, French C. Applications of fluorescence in situ hybridisation in Cytopathology. *Acta Cytol.* 2005;49:587-594)
120. Hiles JJ, Kolesar JM. Role of Sunitinib and Sorafenib in the Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Am J Health-Syst Pharm.* 2008;65(2):123-131
121. Pace M, Cauley H D, A Review of Renal Cell Carcinoma, *US Pharmacist.* 2007;1:7-21.
122. Wu H-C, Huang C-T, Chang D-K. Anti-Angiogenic Therapeutic Drugs for Treatment of Human Cancer. *Journal of Cancer Molecules* 2008; 4(2):37-45
123. Giuseppe Giacone The value of individualised cancer treatment Bethesda, MD, USA, Educational Symposium, 33rd European Society for Medical Oncology Congress, Stockholm, Sweden, September 12. 2008



124. Marshall FF. Nomograms for renal cell carcinoma BJU International. 2005: 95 (supl 2):14-15
125. Kluger M H, Siddiqui F S, Angeletti C, Sznol M, Kelly W K, Molinaro A M, Camp R L. Classification of renal cell carcinoma based on expression of VEGF and VEGF receptors in both tumorcells and endothelial cells. Laboratory investigation. 2008;88:965-972.
126. M. Nakagawa, A. Emoto, T. Hanada, N. Nasu, Y.Nomura, Tubulogenesis by microvascular endothelial cells is mediated by vascular endothelial growth factor(VEGF) in renal cell carcinoma, Br. J. Urol. 1997.79;681–687
127. Aydin S, Signorelli S, Lechleitner T, Joannidis M, Pleban C, Perco P, Pfaller W, Jennings P.Influence of microvascular endothelial cells on transcriptional regulation of proximal tubular epithelial cells.Am J Physiol Cell Physiol. 2008;294:C543-54
128. Tufro A, Norwood VF, Carey RM, Gomez RA.Vascular endothelial growth factor induces nephrogenesis and vasculogenesis.J Am Soc Nephrol. 1999;10:2125-34.
129. Nicol D, S.I. Hii, M. Walsh, B. Teh, L. Thompson, et al.,Vascular endothelial growth factor expression is increased in renal cell carcinoma, J. Urol. 157 (1997) 1482–1486.)
130. Matsumoto K, K. Suzuki, H. Koike, K. Okamura, K.Tsuchiya, et al., Prognostic significance of placental growth factor levels in renal cell cancer; an association with clinical characteristics and vascular endothelial growth factor levels, Anticancer Res. 23 (2003) 4953–4958.
131. Minardi D, Lucarini G, Mazzucchelli R, Milanese G, Natali D, et al., Prognostic role of Fuhrman grade and vascular endothelial growth factor in pT1a clear cell carcinoma in partial nephrectomy specimens, J. Urol. 174 (2005) 1208–1212.
132. Negrier S, D. Perol, C. Menetrier-Caux, B. Escudier, M. Pallardy, et al., Interleukin-6, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma:prognostic value of interleukin-6 – from theGroupe Franc, ais d’Immunotherapie, J. Clin. Oncol. 22(2004) 2371–2378.
133. Yang C.C, K.C. Chu, W.M. Yeh, Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma is correlated with cancer advancement, J. Clin. Lab. Anal.17 (2003) 85–89.[38]

134. Yildiz E, G. Gokce, H. Kilicarslan, S. Ayan, O.F. Goze, E.Y. Gultekin, Prognostic value of the expression of Ki67, CD44 and vascular endothelial growth factor and microvessel invasion in renal cell carcinoma, *BJU Int.* 93(2004) 1087–1093
135. Dosquet C, M.C. Coudert, E. Lepage, J. Cabane, F. Richard, Are angiogenic factors, cytokines, and soluble adhesion molecules prognostic factors in patients with renal cell carcinoma?, *Clin. Cancer Res.* 3 (1997) 2451–2458.
136. Lissoni P, L. Fumagalli, L. Giani, F. Rovelli, G. Confalonieri, S. Pescia, Vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels during cancer immunotherapy with IL-2: preliminary consideration, *Int. J. Biol. Markers* 13 (1998) 98–101.
137. Wechsel H.W, K.H. Bichler, G. Feil, W. Loeser, S. Lahme, E. Petri, Renal cell carcinoma: relevance of angiogenetic factors, *Anticancer Res.* 19 (1999) 1537–1540.
138. Baldewijns MM, Thijssen VL, Vanden Eynden GG, Van Laere SJ, Bluekens AM, Roskams T, van Poppel H, De Bruine AP, Griffioen AW, Vermeulen PB, High-grade clear cell renal cell carcinoma has higher angiogenic activity than low grade based on histomorphological quantitation and q RT-PCR mRNA expression profile *British Journal of Cancer.* 2007;96:1888-1895
139. Kohler H.H, P.J. Barth, A. Siebel, E.W. Gerharz, A. Bittinger, Quantitative assessment of vascular surface density in renal cell carcinomas, *Br. J. Urol.* 77 (1996) 650–654.
140. MacLennan G.T, D.G. Bostwick, Microvessel density in renal cell carcinoma: lack of prognostic significance, *Urology* 46 (1995) 27–30
141. Strohmeyer D, Pathophysiology of tumour angiogenesis and its relevance in renal cell cancer, *Anticancer Res.* 19(1999) 1557–1561.
142. Yoshino, M. Kato, K. Okada, Prognostic significance of microvessel count in low stage renal cell carcinoma, *Int. J. Urol.* 2 (1995) 156–160
143. S. Yoshino, M. Kato, K. Okada, Evaluation of the prognostic significance of microvessel count and tumour size in renal cell carcinoma, *Int. J. Urol.* 5 (1998) 119–123
144. Kondo K, Klco J, Nakamura E, Lechpammer M, Kaelin WG Jr. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell.* 2002;1:237-46.

145. Folberg R, Hendrix M J.C., Maniotis A J. Vasculogenic Mimicry and Tumor Angiogenesis. *Am J Pathol*,2000;156:361-381
146. Nasu R, Kimura H, Akagi K, Murata T, TanakaY. Blood flow influences vascular growth during tumor angiogenesis. *Br J Cancer* 1999;79:780-786.)
147. Chevillet JC, Zincke H, LohseCM, Sebo TJ, Riehle D, Weaver AL, Blute ML. pT1 clear renal cell carcinoma: a study of the association between MIB-1 proliferative activity and pathologic features and cancer specific survival.*Cancer*. 2002; 94(8):2180-4)
148. Langner C, Ratschee M, Rehak P, Tsybrovskyy O, Zigeuner R. The pT1a and pT1b category in renal cell carcinoma: is it reflected by differences in tumour biology? *BJU International*. 2005;95:310-314).
149. Mathers ME, Richards J, O'Donel M. , Expression of VEGF in organ confined conventional renal cell carcinoma. Synopses of papers. Pathological Society of Great Britain and Ireland 182nd meeting 3-5 January 2001.
150. Jenbacken K, Vallbo C, Wang W, Danberg JE. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C) and VEGF Receptor-3 in Human Prostate Cancer Is Associated With Regional Lymph Node Metastasis. *The Prostate*. 2005;65:110-116
151. Hashimoto I, Kodama J, Seki N, Hongo A, Yoshinouci M, Okuda H, Kudo T. Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br J Cancer*.2001;85(1):93-97
152. O-charoentrat P, Rhys-Evans P, Eccles A. Expression of vascular endothelial family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer* 2001;92(3):556-658)
153. Foster RR, Satchell SC, Seckley J, Emmett MS, Joory K, Xing CY, Saleem MA, Mathieson PW, Bates DO, Harper SJ.VEGF-C promotes survival in podocytes.*Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;291:F196-207
154. Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Turner K, Scott PA, Robinson BA, Harris AL, Fox SB.Vascular endothelial growth factor-B and vascular endothelial growth factor-C expression in renal cell carcinomas: regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia.*Cancer Res*. 2001;1;61:3206-11.
155. Leppert JT, Lam JS, Yu H, Selingson DB, Dong J, Horvath S, Pantuck AJ, Belldgrun AS, Figlin RA. Targeting the vascular endothelial growth factor pathway in renal cell carcinoma: a tissue array based analysis. *Journal of*

- clinical oncology, 2005 ASCO annual Meeting Proceedings. Vol 23, No 165(June 1 Supplement), 2005:4536
156. Bando H, Brokelmann M, Toi M, Alitalo K, Sleeman JP, Sipos B, Grone HJ, Weich H. Immunodetection and quantification of vascular endothelial growth factor receptor-3 in malignant tumor tissues. *Int.J. Cancer*.2004;111:184-192
  157. Takahisa I, Yasuyoshi M, Shigeno K, Masaharu N, Tomayoshi H, Hideki S, Hiroshi K. Lymphangiogenesis and angiogenesis in conventional renal cell carcinoma asociacion with vascular endothelial growth factors A-D immunohistochemistry *Urology* 2008;71(4):749.754.
  158. Di Cristofano C, Minervini A, Menicagli M, Salinitri G, Bertacca G, Pefanis G, Masieri L, Lessi F, Collecchi P, Minervini M, Carini M, Bevilacqua G, Cavazzana A. Nuclear Expression of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  in Clear Cell Renal Cell Carcinoma is Involved in Tumor Progression. *Am. J. Surg. Pathol.* 2007;31:1875-1881
  159. Klatte T, Seligson DB, Riggs SB, Leppert JT, Berkman MK, Kleid MD, Yu H, Kabbinavar FF, Pantuck AJ Belldegrun AS. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2007;13(24):7388-7393
  160. Shaw K.Environmental Cues Like Hypoxia Can Trigger Gene Expresion and Cancer Development. *Nature Education.* 2008;1(1).
  161. Kubis PH, Hanke N, Scheibe RJ, Gros G. Accumulation and nuclear import of HIF1 alpha during high and low oxygen concetration in skeletal muscle cells in primary culture. *Biochimica and Biophysica.* 2005;1745:187-195
  162. Sutter C.H, Laughner E, Semenza G.I, Hypoxia-inducible factor1 $\alpha$  protein expression is controled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletion and missense mutation. *Proc. Nad. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97:4748-4753
  163. Amazit L, ALJ Y, Tyagi K, Chauchereau A, Loosfelt H, Pichon C, Panthel J, Foulon-Guinhard E, Leclerc F, Milgrom E, Guichon-Mantel A. Subcellular Localization and Mechanisms of Nucleocytoplasmic Trafficking of Steroid Receptor Coactivator-1, *JBC* 2003;278(34):32125-32203.
  164. Jubb AM, Pham TQ, Hanby AM, Frantz GD, Peale FV, Wu TD, Koeppen HW, Hillan KJ. Expression of vascular endothelial factor , hipoxia inducible factor-1  $\alpha$ , and carbonic anhydrase IX in human tumors. *J Clin Pathol.* 2004;57(5):504-512.

165. Shintani K, Matsumine A, Kusuzaki K, Matsubara T, Satonaka H, Wakabayashi T, Hoki Y, Uchida A. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  as a biomarker of outcome in soft-tissue sarcomas. *Virchows Arch.* 2006;449:673-681.
166. Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Bergh A, Ljungberg B. Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  Expression in Renal Cell Carcinoma Analyzed by Tissue Microarray. *Eur. Urol.* 2006;50:1272-7.
167. Warburton HE, Brady M, Vlatković N, Marston Linehan W, Parsons K, Boyd MT. P53 Regulation and Function in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* 2005;65(15):6498-6503
168. Zigeuner R, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Langner C. Value of p53 as a prognostic marker in histologic subtypes of renal cell carcinoma: a systematic analysis of primary and metastatic tumor tissue *Urology* 2004;63(4)651-655
169. Kabiri M, Mohammadi Sichani M, Mohajery MR, Taheri D, Chehrei A. Prognostic value of p53 in renal cell carcinoma. *Iranian Journal of Pathology* 2006;1(2):75-80
170. Gurova VK, Hill JE, Razorenova OV, Chumakov PM, Gudkov AV. p53 Pathway in Renal Cell Carcinoma Is Repressed by a Dominant Mechanism. *Cancer Research.* 2004;64:1951-1958.
171. Caio M. Rocha-Lima, Heloisa P. Soares, Luis E. Racz, Rakesh Singal. EGFR Targeting of Solid Tumors. *Cancer Control.* 2007;14(3):295-299.
172. Kallio J.P, Hirvikoski P, Helin H, Kellokumpu-Lehtinen P, Luukkaala T, Tammela T.LJ, Martikainen P.M. Membranous location of EGFR immunostaining is associated with good prognosis in renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer.* 2003;89:1266-1269.
173. Uhlman DL, Nguyen P, Manivel JC, Zhang G, Hagen K, Fraley E, Aeppli D, Niehans GA. Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha expression in papillary and nonpapillary renal cell carcinoma: correlation with metastatic behavior and prognosis. *Clin. Cancer Res* 1995;8:913-920 .
174. Moch H, Sauter G, Bucholz N, Gasser TC, Bubendorf L, Waldman FM, Mihatsch J. Epidermal growth factor receptor expression is associated with rapid tumor cell proliferation in renal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 1997;28:1255-1259.

175. Langner C, Ratschek M, Rehak, Schips L, Zigeuner R. Are heterogeneous results of EGFR immunoreactivity in renal cell carcinoma related to non-standardised criteria for staining evaluation?. *J Clin Pathol.* 2004;57(7):773-775.
176. Sini P, Wyder L, Schnell C, O'Reilly, Littlewood, Brandt R, Hynes E. N, Wood J. The tumor and antiangiogenic activity of vascular endothelial growth factor receptor inhibition is potentiated by ErbB1 blockade. *Clin. Cancer Res.* 2005;11(12):4521-32
177. Parikh AA, Liu WB, Fan F, Stoeltzing O, Reinmuth N, Bruns J C, Bucana CD, Evans DB, Ellis LM. Expression and Regulation of the Novel Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Neuropilin-1 by Epidermal Growth Factor in Human Pancreatic Carcinoma. *Cancer.* 2003;98(4):720-729
178. Roepstorff K, Grovdal L, Grandal M, Lerdrup M, Deurs B van, Endocytic downregulation of Erb receptors: mechanisms and relevance in cancer. *Histochem Cell Biol.* 2008;129:563-568)
179. Dancey JE Epidermal Growth Factor receptor and Epidermal Growth Factor receptor Therapies in Renal Cell Carcinoma: Do We Need a Better Mouse Trap? *Journal of Clinical Oncology* 2004;22(15):2975-2977
180. Wykoff CC, Beasley N, Watson JP, Turner PH, Pastorek KJ, Wilson J, Turley GD, Maxwell H, Pugh PH, Ratcliffe CW PJ, Harris AL. Hypoxia inducible regulation of tumor associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 2001;60:7075-7083
181. Đorđević G, Matušan-Ilijaš K, Sinožić E, Damante Đ, Fabbro D, Grahovac B, Lučin K, Jonjić N, Relationship Between Vascular Endothelial Growth Factor and Nuclear Factor  $\kappa$ B in Renal Cell Tumors. *Croat Med J.* 2008;49:587-596.
182. Giatromanolaki A, Koukourakis MJ, Siviridis E, Pastorek J, Wykoff C, Gatter KC, Harris A. Expression of Hypoxia-inducible Carbonic Anhydrase-9 Relates to Angiogenic Pathways and Independently to Poor Outcome in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research.* 2001;61:7992-7998
183. Thoenes W, Storkel S, Rumpelt HJ, Histopathology and Classification of Renal Cell Tumors (Adenomas, Oncocytomas, and Carcinomas, *Path.Res.Pract.* 1986;181:125-143

## **8. ŽIVOTOPIS**

### **I. OSOBNI PODACI**

Mr. sci. Gordana Đorđević dr. med.  
Zavod za patologiju i patološku anatomiju  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci  
Braće Branchetta 20  
51000 Rijeka  
Tel:(051)325-827  
Fax: (051)325-810

Datum i mjesto rođenja:  
16. ožujak 1958. u Rijeci  
Kućna adresa:  
Antona Raspora 8,51 410 Opatija  
Tel:(051) 603-099  
E-mail: dgordana@net.hr

### **II. OBRAZOVANJE**

1976-1982.: Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

1982-1983 : Obvezatan pripravnički staž u Kliničkom bolničkom centru Rijeka

1983.: Završni stručni ispit

1989.-1994.:Specijalistički staž iz Patološke anatomije

1994.: Specijalistički ispit iz Patološke anatomije

1984.-1986: Poslijediplomski znanstveni studij iz kliničke patofiziologije

2004.: akademski naslov magistra znanosti

#### **Radno iskustvo:**

1983.- 1989. Liječnik Hitne medicinske pomoći "Dom zdravlja Krk"

1989. stručni suradnik na Zavodu za patologiju i patološku anatomiju  
Medicinskog fakulteta u Rijeci

1994. Specijalista patolog na Zavodu za patologiju i patološku anatomiju  
Medicinskog fakulteta u Rijeci

### **III. AKADEMSKA I STRUČNA DRUŠTVA**

Hrvatski liječnički zbor od 1982.

Hrvatsko društvo patologa i sudskih medicinara od 1994.

Liječnička komora od 2001. godine

#### **IV. STRUČNI I ZNANSTVENI RADOVI**

##### **Kvalifikacijski radovi:**

Đorđević G. Ispoljavanje PRAD 1 / CIKLIN D1 i Ki 67 u hiperplaziji paratireoideje izazvanoj kroničnim bubrežnim zatajenjem. Magistarski rad. Medicinski fakultet Sveučilište u Rijeci, ožujak, 2004.

##### **1. Znanstveni radovi**

###### **1.1. Primarni znanstveni radovi objavljeni u časopisu citiranom u tercijarnim publikacijama (Current Contents)**

1. Maričić A., Đorđević G, Petranović D, Pavlović-Ružić I, Orlić P, Mozetić V, Valenčić M. Bellini-Gang-Karzinom-eine ungewöhnliche Preaesentation. Aktuel. Urol 2004;35:134-6
2. Lucin K, Matusan K, Dordevic G, Stipic D. Prognostic significance of CD44 molecule in renal cell carcinoma. Cro Med J 2004 Dec;45(6):703-8
3. Bobinac D. Marić I, Zoričić S, Španjol J, Đorđević G, Mustać E, Fučkar Ž. Expression of Bone Morphogenetic Proteins in Human Metastatic Prostate and Breast Cancer Cro Med J 2005; 46: 389-396
4. Matušan K, Đorđević G, Stipić D, Mozetić V, Lučin K. Osteopontin Expression Correlates With Prognostic Variables and Survival in Clear Cell Renal cell Carcinoma, Journal of Surgical Oncology 2006; 00: 1-7
5. Matušan K, Đorđević G, Mozetić V, Lučin K, Expression of Osteopontin and CD 44 Molecule in Papillary Renal Cell Tumors Pathology, Oncology Research. 2005;11(2):1-8
6. Živčić-Ćosić S, Gržetić M, Valenčić M, Oguić R, Maričić A, Đorđević G, Balen S, Orlić L, Rački S, Fučkar Ž, Urothelial Cancer in Patients with Endemic Balkan Nephropathy (EN) after Renal Transplantation, Renal Failure, 2007;29:861-867.
7. Djordjevic G, Mozetic V, Vrdoljak-Mozetic D, Licul V, Matusan-Ilijas K. Mustac E, Oguic R, Fuckar Z, Jonjic N, Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in clear cell renal cell carcinoma, Path Res Pract 2007;203:99-106
8. Đorđević G, Matušan-Ilijaš K, Sinožić E, Damante Đ, Fabbro D, Grahovac B, Lučin K, Jonjić N, Relationship Between Vascular Endothelial Growth Factor and Nuclear Factor –kB in Renal Cell Tumors. Croat Med J. 2008;49:587-596.



9. Mustać E, Zamolo G, Petković M, Đorđević G, Radić J, Grgurević E, Batinac T, Breast Infiltrating Ductal Carcinoma: Analysis of Hormone, HER-2 Receptors and Ki-67 Proliferation Marker, Coll Antropol. 2008; 3:741-746

## **1.2. Primarni znanstveni radovi objavljeni u časopisu citiranom u sekundarnim publikacijama(Index medicus, Excerpta medica)**

1. Markić D, Fučkar Ž, Đorđević G. Učestalost i klinička značajnost prostatične intraepitelijalne neoplazije u biopsiji prostate Acta Fac med Flum 2002;27(1-2):1-4
2. Đorđević G, Peitl V, Sinožić E, Mustać E. Patologija u urologiji. Medicina 2004;42(40): 147-152

## **2. Znanstveni projekti**

- 2.1 062-0620095-0082 - **Jonjić Nives** Regulacijski čimbenici angiogeneze u prognozi i kliničkom praćenju tumora
- 2.2 062-0620095-0077 - **Mustać Elvira**: Molekularni mehanizmi tumorske ekspresije i metastaziranja raka dojke i prostate

## **3. Sudjelovanje na znanstvenim skupovima**

### **3.1. Sudjelovanje na međunarodnom skupu**

1. Đorđević G, Jonjić N, Matić-Glažar Đ, Licul V. Expression of cyclin D1 in secondary parathyroid hyperplasia. The 19<sup>th</sup> European Congress of Pathology 2003. Virchow Archiv 2003; 443 (3): 379
2. Lučin K, Matušan K, Đorđević G, Stipić D. The expression of osteopontin in renal-cell carcinoma. Proceedings of free papers; II International congress of Pathology: Iguassu Falls, Brasil 2004
3. Bobinac D, Marić I, Zoričić S, Španjol J, Đorđević G, Mustać E, Fučkar Ž, Expression of bone morphogenetic proteins in Human prostate and breast cancer. 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society June 25-29:2005 , Bone 36(2)5103-5479
4. Šnjarić D, Horvat J, Kuis D, Kovačević M, Tamarut T, Bešlić S, Bobinac D, Jonjić N, Đorđević G, Quantitative Fluorescence Analysis of Bone Deposition After Doxycycline Administration During Endodontic Therapy- A pilot study, 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the European Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society June 25-29:2005 , Bone 36(2)5103-5479
5. Matušan K, Đorđević G, Hadisejtić I, Grahovac B, Giuseppe D'Amante, Lučin K, Jonjić N. Relationship between vascular endothelial growth factor and nuclear factor κ B in renal cell carcinoma, 21<sup>st</sup> European Congress of Pathology September 8-13, 2007

### 3.2 Sudjelovanje na domaćem skupu s međunarodnim sudjelovanjem

1. Đorđević G. Pathomorphology of our routine synovial biopsy specimen. The 7<sup>th</sup> "Ljudevit Jurak" International Symposium on Comparative Pathology, 1996
2. Đorđević G, Jonjić N, Krstulja M. Microvessel quantitation in synovium. The 8<sup>th</sup> "Ljudevit Jurak" International Symposium on Comparative Pathology, 1997
3. Krstulja M, Đorđević G. Proliferation in the lining and stromal cells of synovia in inflammatory disease with tissue remodelling. Fifth International Workshop on Applications of AgNOR in Pathology, Zaragoza, 1997. publicirano kao sažetak u Analytical cellular pathology ACPAER 16/2, 63-64, 1998
4. Đorđević G, Jonjić N, Ivošević D. Angiogenesis in different types of renal cell carcinoma. The 8<sup>th</sup> "Ljudevit Jurak" International Symposium on Comparative Pathology, 1998
5. Đorđević G, Jonjić N, Mustać E. Kratki prikaz pet kliničko-patoloških dijagnostičkih problema rijetkih neoplazmi bubrega. Second Croatian Urological Congress with International Participation, 1988, Rijeka, Croatia, Abstract book, 83
6. Zamolo G, Đorđević G, Mustać E. Pseudosarkomatozni fibromiksoidni tumor funikulusa – prikaz slučaja. Second Croatian Urological Congress with International Participation, 1998, Rijeka, Croatia, Abstract book, 83
7. Đorđević G, Jonjić N. Tumoral heterogeneity of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in renal cell carcinoma. The 11<sup>th</sup> "Ljudevit Jurak" International Symposium on Comparative Pathology, 2000
8. Đorđević G, Mustać E, Orlić P, Bobinac D, Zoričić S, Ivančić A. BMP-7 expression in tumoral calcifications and brown tumor of secondary hyperparathyroidism, The 17<sup>th</sup> International Meeting of Adriatic Society of Pathology, June 28-30, 2002; Abstract Book, 42.
9. Mustać E, Zamolo G, Petković M, Đorđević G, Čoklo M, Modrčin D, Žauhar G, Batinac T, Sonnenschein I, Mokrović H, Jonjić N, Dobrila F., A combined histological and immunohistochemical approach in evaluation of discordant receptor breast carcinomas 3<sup>rd</sup> Croatian Congress of Pathology and Forensic Medicine, 3<sup>rd</sup> Croatian congress of clinical Cytology and 1<sup>st</sup> Croatian Symposium of Cytotechnology May, 8-11, 2005, Abstract Book ;71
10. Matušan K, Đorđević G, Mozetić V, Lučin K, Expression of Osteopontin and CD 44 Molecule in Papillary Renal Cell Tumor, 3<sup>rd</sup> Croatian Congress of Pathology and Forensic
11. Medicine, 3<sup>rd</sup> Croatian congress of clinical Cytology and 1<sup>st</sup> Croatian Symposium of Cytotechnology May, 8-11, 2005, Abstract Book ;87.
12. Đorđević G, Mozetić V, Vrdoljak-Mozetić D, Jonjić N, Licul V, Matušan K, Mustać E, Oguić R, Fučkar Ž. Correlation between vascular endothelial growth

factorexpression and angiogenesis in renal cell carcinoma, 3<sup>rd</sup> Croatian Congress of Pathology and Forensic Medicine, 3<sup>rd</sup> croatian congress of clinical Cytology and 1<sup>st</sup> Croatian Symposium of Cytotechnology May, 8-11, 2005, Abstract Book ;88

13. Đorđević G, Mustać E, Bobinac D, Zoričić S, Španjol J, Fučkar Ž, Bone morphogenetic protein expression in normal and malignant prostate and breast, 3<sup>rd</sup> Croatian Congress of Pathology and Forensic Medicine, 3<sup>rd</sup> croatian congress of clinical Cytology and 1<sup>st</sup> Croatian Symposium of Cytotechnology May, 8-11, 2005, Abstract Book ;98.
14. Đorđević G, Golemac M, Dekanić A, Vranešić Đ, Dessardo S, A case of fatal mitochondrial cardiomyopathy, 3<sup>rd</sup> Croatian Congress of Pathology and Forensic Medicine, 3<sup>rd</sup> croatian congress of clinical Cytology and 1<sup>st</sup> Croatian Symposium of Cytotechnology May, 8-11, 2005, Abstract Book;106.
15. Đorđević G, Sinožić E, Matušan K, Jonjić N, Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  correlates with vascular endothelial growth factor-A and C in clear cell renal cell carcinoma, 4. Hrvatski kongres patologa i sudskih medicinara, rujan 25-28, 2008; poster prezentacija

## ***9. POPIS SKRAĆENICA***

**VEGF** – vaskularni endotelni čimbenik rasta ( prema engleskom nazivu vesicular endothelial growth factor)  
**VPF** – vaskularni čimbenik propusnosti (prema engleskom nazivu vascular endothelial permeability factor)  
**TAF**- čimbenik tumorske angiogeneze ( prema engleskom nazivu Tumor angiogenesis factor)  
**VEGFR**- receptor vaskularnog endotelnog čimbenika rasta ( prema engleskom nazivu vascular endothelial growth factor receptor)  
**HIF-1 $\alpha$**  – hipoksijom pobuđeni čimbenik- 1 $\alpha$  ( prema engleskom nazivu Hypoxia inducible factor -1 $\alpha$  )  
**EGFR** – receptor epidermalnog čimbenika rasta ( prema engleskom nazivu Epidermal growth factor receptor )  
**EGF** - epidermalni čimbenik rasta ( prema engleskom nazivu Epidermal growth factor )  
**KBS**- karcinom bubrežnih stanica  
**SSKBS**- svjetlostanični karcinom bubrežnih stanica  
**MVD**- srednja gustoća krvnih žila ( prema engleskom nazivu mean vascular density )  
**TMA** – tumorski mikroareji  
**FISH** – fluorescentna in situ hibridizacija  
**PDGF**- iz trombocita derivirani čimbenik rasta (prema engleskom nazivu platelet derived growth factor)  
**PDGFR**- receptor iz trombocita deriviranog čimbenika rasta (prema engleskom nazivu platelet derived growth factor receptor)  
**ECM**- ekstracelularni matriks ( prema engleskom nazivu extracellular matrix)  
**NRP**- neuropilin  
**PKR 1**- receptor za prokineticin 1  
**Eph**- epinefrin  
**SP1**- Sp1 transkripcijski faktor  
**EDG1**- diferencijacijski gen endotela (prema engleskom nazivu endothelial differentiation gene 1)  
**Ang 1,2**- angiopoetin 1,2  
**Tie 1,2**- tirozin kinaza sa imunoglobulin sličnom ili EGF sličnom domenom  
**TGF**- transformirajući čimbenik rasta (prema engleskom nazivu transforming growth factor )  
**ALK** – kinaza anaplastičnog limfoma ( prema engleskom nazivu anaplastic lymphoma kinasis)  
**Syk /SLP 76** – limfocitni citosolni protein 2  
**MMP**- matriksne metaloproteinaze  
**PIGF** – placentalni čimbenik rasta (prema engleskom nazivu platelet derived growth factor)  
**NO** – dušikov oksid  
**IL**- interleukin  
**TNF**- čimbenik tumorske nekroze  
**RAS**- protein za provodnju signala

**RAF**- serine threonine selektivna kinaza  
**MEK**- serine threonine selektivna kinaza  
**ERK**- regulirajuća kinaza ekstracelularnog signala extracellular signal regulated kinase  
**MAPK**- mitogen aktivirana protein kinaza  
**AKT**- serine threonine selektivna kinaza  
**ELK-1** ETS like 1 gene  
**STAT**- transkripcijski faktor  
**PI3K**- fosfoinositide-3 kinaza  
**mTOR**- mamalian target of Rapamycin  
**NF  $\kappa$ B**- nuclear factor kapa B  
**ARNT**- aryl hydrocarbon nuclear translocator  
**pVHL**- von Hippel Lindau protein  
**ROS**- reactive oxygen species  
**ATP**- adenozintrifosfat  
**FGF**- fibroblastni čimbenik rasta ( prema engleskom nazivu fibroblast growth factor)  
**NOS**- nitrogen oxygen species  
**EPO**- eritropoetin  
**GLUT-1** - glutation  
**IGF** – inzulinski čimbenik rasta (prema engleskom nazivu insulin growth factor)  
**Erb B**- receptor tirozin-protein kinaze  
**Her2-neu** – receptor za humani epidermalni čimbenik rasta (prema engleskom nazivu human epidermal growth factor receptor)  
**Cdk**- o ciklinima ovisna kinaza (prema engleskom nazivu cyclin dependent kinase)  
**PKD**- protein kinaza D  
**mdm2**- mouse double minute 2  
**EDTA**-etilenediaminetetraacetic acid  
**HE**- hemalaun eozin  
**pVEGF**- perimembranozna ekspresija VEGF  
**dVEGF**- difuzna citoplazmatska ekspresija VEGF  
**cHIF-1 $\alpha$** - citoplazmatska ekspresija HIF-1 $\alpha$   
**nHIF-1 $\alpha$** - nuklearna ekspresija HIF-1 $\alpha$   
**NG**- nuklearni gradus  
**VT**- veličina tumora  
**pT**- patološki stadij bolesti  
**HS**- histoskor